



ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Uso de Epigallocatequina-3-galato e Genisteína como potenciais indutores epigenéticos da hemoglobina fetal

Raquel Sampaio Alves dos Santos

Orientadores:

Prof^a. Doutora Edna Soraia Gregório Ribeiro (ESTeSL, H&TRC)

Prof. Doutor Rui Miguel Duque de Brito (ESTeSL, H&TRC)

Tese para obtenção do grau de
Mestre em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, Setembro de 2021

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**Uso de Epigallocatequina-3-galato e Genisteína
como potenciais indutores epigenéticos da
hemoglobina fetal**

Raquel Sampaio Alves dos Santos

Orientadores:

Prof^a Doutora Edna Soraia Gregório Ribeiro (ESTeSL, H&TRC)

Prof. Doutor Rui Miguel Duque de Brito (ESTeSL, H&TRC)

Júri:

Presidente: Prof^a Doutora Carina Alexandra Ladeira (ESTeSL)

Arguente: Mestre/Especialista Pedro Venturini (IPST, ENSP/UNL)

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

(Esta versão inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, Setembro de 2021



Uso de Epigallocatequina-3-galato e Genisteína como potenciais indutores epigenéticos da hemoglobina fetal

Raquel Sampaio Alves dos Santos

2021

Este projeto foi financiado pelo **Instituto Politécnico de Lisboa** para o projeto “*Hemofet - Natural compounds potential for reactivation of γ -globin gene expression and fetal hemoglobin induction — An in vitro approach*”, registado como IDI&CAIPL/2019/HemoFet/ESTeSL. O presente trabalho foi desenvolvido no **Health & Technology Research Center (H&TRC)**, localizado na **Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)**, sob supervisão do prof. Doutor Rui Miguel Duque de Brito (ESTeSL) e da prof. Doutora Edna Soraia Gregório Ribeiro (ESTeSL).

O Instituto Politécnico de Lisboa tem o direito ilimitado e intemporal de arquivar e publicar esta dissertação através de cópias digitais ou físicas, ou qualquer outro meio que considerem adequado, com objetivos de investigação ou educação, não comerciais, desde que o autor seja reconhecido para tal.

Copyright © 2021 – Raquel Santos

Agradecimentos

Em primeiro lugar, aos meus orientadores. A vossa ajuda foi preciosa e o conhecimento científico que está neste documento partiu sempre da vossa iniciativa em tentar melhorar a vida de outros e desenvolver a investigação científica. A vossa disponibilidade e simpatia fez com que este trabalho ganhasse “vida” e que o meu esforço tivesse um melhor rumo. O meu mais sincero obrigada.

À Mariana. Obrigada pela tua paciência no laboratório para me ajudares na concretização de tudo o que está aqui presente.

Em terceiro, ao meu namorado. Aturaste os meus dramas, viveste as minhas alegrias e acima de tudo, foste um apoio incondicional. Não podia pedir melhor pessoa para dividir esta viagem. Agora à minha pequena, mas "gigante" família. À melhor do mundo, a minha mãe, obrigada por impulsionares todas as minhas conquistas. Ao meu pai, avó e por fim, mas não em último, ao meu mano que me deu os sobrinhos mais lindos deste universo.

Ao meu eterno duo da faculdade (eles sabem quem são). Vocês acompanharam os meus momentos de riso e tristeza, sem me deixar sozinha quando precisei. Foi um gosto partilhar este percurso convosco!

À minha melhor amiga. Sinto que já vivemos várias vidas juntas e de algum modo, este foi apenas mais uma etapa na nossa viagem. Sabes o quanto vales para mim.

Introdução: As β -hemoglobinopatias são uma das doenças autossômicas recessivas mais comuns em todo o mundo. A indução farmacológica da hemoglobina fetal (HbF) é uma estratégia terapêutica promissora e a hidroxiureia (HU) é um fármaco aprovado pela Agência Europeia do Medicamento para este efeito. No entanto, é necessária a identificação de novos agentes com maior atividade indutora, menor toxicidade celular e custo.

Mecanismos como a metilação do DNA e acetilação das histonas podem regular a expressão gênica e os compostos naturais são potentes moduladores epigenéticos.

A genisteína (GN), um flavonoide da soja, e a epigallocatequina-3-galato (EGCG), principal polifenol do chá verde, foram associados a efeitos epigenéticos e previamente identificados como potenciais indutores da HbF sem efeitos citotóxicos em células K562.

Objetivo: Avaliar a modulação epigenética da EGCG e GN na potencial indução da HbF.

Material e Métodos: O RNA total de células da linhagem K562 previamente expostas durante 72 ou 96 horas à GN e EGCG em 3 concentrações (100, 250 e 500 ng/mL) e à HU a 25 μ g/mL, foi quantificado e convertido a cDNA. Por sua vez, este foi usado para avaliar os seus efeitos transcricionais em moduladores epigenéticos (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *HDAC* de classe I) pelo qRT-PCR com primers específicos.

Resultados: A EGCG afeta maioritariamente a transcrição da *HDAC2* e *HDAC8* em ambos os tempos de exposição, enquanto a GN influencia os níveis de expressão gênica da metilação às 72 horas (especialmente da *DNMT1*) e desacetilação nos dois tempos (*HDAC1*, *HDAC3* e *HDAC8*). A análise transcricional de ambos revela uma dose resposta não monotónica (DRNM). A HU aparenta ter efeitos divergentes, com impacto transcricional na metilação em ambos os tempos de exposição (*DNMT3A*) e da desacetilação às 96 horas (*HDAC1* e *HDAC8*).

Conclusão: Sucintamente, os nossos resultados apoiam a hipótese que a EGCG e a GN podem atuar como moduladores epigenéticos perante o seu potencial indutor da HbF e serem eventualmente, futuros candidatos a novos agentes terapêuticos nas hemoglobinopatias.

Palavras-chave: Epigallocatequina-3-galato; Genisteína; Hemoglobina fetal; Moduladores epigenéticos; Hidroxiureia.

Introduction: β - hemoglobinopathies are one of the most common autosomal recessive diseases in the world. The pharmacologic induction of fetal hemoglobin (HbF) is a promising therapeutic strategy and hydroxyurea (HU) is an approved drug by the European Medicine Agency with this purpose. However, it's necessary to identify new agents with higher HbF inducing activity, less toxic and expensive.

Mechanisms like DNA methylation and histone acetylation might regulate genetic expression and natural compounds are powerful epigenetic modulators.

Genistein (GN), a soy flavonoid, and Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), major green tea component, were associated to epigenetic effects and previously identified as potential HbF inducers without cytotoxic effects in K562 cells.

Objective: Evaluate the epigenetic modulation by EGCG and GN in their potential HbF induction.

Material and Methods: Total RNA from cells of the K562 lineage previously exposed for 72 or 96 hours to GN and EGCG in 3 concentrations (100, 250 and 500 ng/mL) and to HU at 25 μ g/mL was quantified and converted to cDNA. In turn, this one was used to evaluate their transcriptional effects in epigenetic modulators (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e class I *HDAC*) by qRT-PCR using specific primers.

Results: EGCG mostly affects transcription of *HDAC2* and *HDAC8* at both exposure times, while GN influences the genetic expression levels of methylation at 72 hours (specially *DNMT1*) and deacetylation at both times (*HDAC1*, *HDAC3*, and *HDAC8*). The transcriptional analysis of both reveals a non-monotonic dose response (NMDR). HU appears to have divergent effects, with impact in methylation transcription at both exposure times (*DNMT3A*) and desacetylation at 96 hours (*HDAC1* and *HDAC8*).

Conclusion: Succinctly, our results support the hypothesis that EGCG and GN might act as epigenetic modulators in relation to their potential HbF induction and are might be future candidates as new therapeutic agents in hemoglobinopathies.

Keywords: Epigallocatechin-3-gallate; Epigenetic modulators; Fetal hemoglobin; Genistein; Hemoglobinopathies; Hydroxyurea.

Índice geral

Agradecimentos	VII
Resumo.....	VIII
Abstract.....	IX
Índice geral.....	XI
Índice de tabelas	XIII
Índice de figuras.....	XV
Abreviaturas	XVII
1. Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Questão de investigação.....	2
1.2. Objetivos.....	2
1.2.1. Geral.....	2
1.2.2. Específicos	2
2. Capítulo 2 – Revisão da literatura	3
2.1. Hemoglobina humana	3
2.2. Regulação da expressão de hemoglobina	4
2.2.1. BCL11A	5
2.2.2. KLF1 ou EKLF	6
2.2.3. HBSL-1-MYB (HMIP)	7
2.2.4. BGLT3	7
2.2.5. Regulação epigenética	8
2.2.5.1. Metilação do DNA	8
2.2.5.2. Acetilação de histonas	9
2.3. Hemoglobinopatias	9
2.3.1. Beta-talassémia	10
2.3.2. Doença falciforme	11
2.4. Terapêuticas	12
2.4.1. Transfusões sanguíneas.....	13
2.4.2. Transplante de células estaminais hematopoiéticas	14
2.4.3. Reativação da hemoglobina fetal	14
2.4.3.1. Reguladores epigenéticos.....	15
2.4.3.2. Hidroxiureia.....	16
2.5. Compostos naturais como moduladores epigenéticos	17

2.5.1. Epigallocatequina-3-galato (EGCG).....	17
2.5.2. Genisteína (GN).....	18
3. Capítulo 3 - Materiais e métodos	21
3.1. Classificação do estudo	21
3.2. Variáveis em estudo	21
3.3. Instrumento de recolha de dados.....	21
3.4. Linhagem celular K562	22
3.5. Procedimentos	23
3.5.1. Cultura das células K562, exposição à EGCG ou GN e viabilidade celular	24
3.5.2. Extração e quantificação do RNA total.....	25
3.5.3. Conversão do RNA total a cDNA (transcriptase reversa).....	26
3.5.4. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	26
3.6. Tratamento estatístico.....	28
3.7. Considerações ético-legais	28
4. Capítulo 4 - Resultados e discussão.....	29
4.1. Apresentação de resultados.....	29
4.1.1. A GN demonstra maior impacto nos níveis de transcrição das <i>DNMT</i> relativamente à EGCG.....	29
4.1.2. A EGCG e GN influenciam os níveis de transcrição das <i>HDAC</i>	32
4.2. Discussão de resultados	37
5. Capítulo 5 - Considerações finais	53
5.1. Conclusões	53
5.2. Estudos futuros	54
6. Capítulo 6 - Referências bibliográficas.....	55
7. Apêndices.....	65
7.1. Apêndice I: Caraterização das variáveis em estudo.....	65
7.2. Apêndice II: Fundamento e procedimento de isolamento e purificação RNA total.....	66
7.3. Apêndice III: Fundamento e procedimento para quantificação do RNA total	69
7.4. Apêndice IV: Quantificação do RNA obtidas nas amostras em estudo através do ensaio Qubit.....	70
7.5. Apêndice V: : Fundamento, teoria base e procedimento para realização do PCR quantitativo em pequena escala	73
7.6. Apêndice VI: Resumo dos níveis de expressão génica pós-tratamento com EGCG, GN e HU	75

Índice de tabelas

Tabela 3.1 - Primers específicos para uso na reação de qRT-PCR.....	26
Tabela 7.1 - Classificação e caracterização das variáveis em estudo.....	65
Tabela 7.2 - Resultados da quantificação do RNA total obtido nas células K562 expostas à GN.....	70
Tabela 7.3 - Resultados da quantificação do RNA total obtido nas células K562 expostas à EGCG.....	72
Tabela 7.4 – Componentes da reação de qRT-PCR	74
Tabela 7.5 - Níveis de expressão génica estatisticamente significativos obtidos nas células K562 pós-tratamento com EGCG, GN e HU.....	75

Índice de figuras

Figura 2.1 - (A) Desenvolvimento humano (em semanas pré e pós-nascimento) e expressão das cadeias de globina (em % de síntese total), conforme o local humano. (B) Constituição gênica dos loci α (cromossoma 16) e β (cromossoma 11).....	3
Figura 2.2 – Reguladores da expressão de hemoglobina e a sua interação com os genes das globinas presentes no cromossoma 11.	5
Figura 2.3 - Algoritmo de diagnóstico das hemoglobinopatias.	10
Figura 2.4 - Terapêuticas para o tratamentos das β -hemoglobinopatias.	13
Figura 2.5 - (A) Estrutura química da epigalocatequina-3-galato (EGCG) e da (B) genisteína (GN) e semelhança estrutural ao estradiol, bem como os comuns efeitos benéficos.	20
Figura 3.1 - (A) Células K562 em suspensão com baixa densidade. Fonte: ATCC, 2016. (B) Morfologia da célula K562 na coloração de Giemsa (evidência do citoplasma basófilo, sem grânulos e dos nucléolos proeminentes)	22
Figura 3.2 – Esquema dos métodos laboratoriais para análise dos efeitos epigenéticos da exposição individual à epigalocatequina-3-galato (EGCG) e genisteína (GN) nas células K562.	23
Figura 4.1 - Efeitos da EGCG na expressão dos genes das DNA metiltransferases.	30
Figura 4.2 - Efeitos da GN na expressão dos genes das DNA metiltransferases.....	31
Figura 4.3 - Efeitos da EGCG na expressão dos genes das histonas desacetilases..	33
Figura 4.4 - Efeitos da GN na expressão dos genes das histonas desacetilases.	35
Figura 7.1 - Fases da curva de amplificação do PCR (base, exponencial, log-linear e plateau) da quantidade relativa da fluorescência emitida em função do número do ciclo.....	74

Abreviaturas

BGLT3	Transcrito do locus da β -globina (<i>Beta Globin Locus Transcript 3</i>)
BCL11A	Proteína <i>B-cell leukemia and lymphoma 11a</i>
BME	β -mercaptoetanol
cDNA	DNA codificante
CHE	Células Hematopoiéticas Estaminais
CRISP	Repetições Palindrómicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
CN	Controlo negativo
CP	Controlo positivo
DF	Doença falciforme
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT	DNA metiltransferases
DRNM	Dose-resposta não monotónica
ESTeSL	Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
GATA1	Proteína de ligação ao GATA (<i>GATA binding protein 1</i>)
GN	Genisteína
GWAS	Estudos de associação genómica ampla (<i>Genome-Wide Association Studies</i>)
HDAC	Histona desacetilases
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina adulta
HbA₂	Hemoglobina adulta minor
HbF	Hemoglobina fetal
HbF switch	Mudança na expressão maioritária da HbF para HbA (pós-parto)
HGM	Hemoglobina globular média
HbS	Hemoglobina S
HbSS	Estado homocigótico de doença falciforme
H&TRC	Centro de Investigação de Tecnologia e Saúde de Lisboa (<i>Health and Technology Research Center of Lisbon</i>)
HLA	Antigénio leucocitário humano (<i>Human leukocyte antigen</i>)

HU	Hidroxiureia
KLF1	Fator de transcrição 1 do tipo Kruppel (<i>Kruppel Like Factor 1</i>)
LCR	Região de controlo do locus (<i>Locus control region</i>)
LnRNA	RNA longo não codificante (<i>Long non-coding RNA</i>)
LMC	Leucemia Mielóide Crónica
Log₂FC	Logaritmo de mudança na expressão génica (<i>Log₂ fold change</i>)
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
MYB	Família de genes MYB
MAPK	Proteínas-quinases ativadas por mitógenos (<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>)
NCoR	Recetor nuclear co-repressor (<i>Nuclear receptor corepressor</i>)
NuRD	Complexo de remodelação do nucleossoma e desacetilase (<i>Nucleosome remodeling and deacetylase complex</i>)
PPAR	Recetor ativado pelo proliferador de Peroxissoma (<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>)
PHHF	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
qRT-PCR	PCR (Reação em cadeia da polimerase ou <i>Polymerase Chain Reaction</i>) quantitativo em tempo real
RNAses	Ribonucleases
RT	Transcriptase reversa
shRNA	RNA curto em gancho (<i>short hairpin RNA</i>)
siRNA	RNA pequeno de interferência (<i>small interfering RNA</i>)
HMEC	Células endoteliais microvasculares humanas (<i>Human Microvascular Endothelial Cells</i>)
TIMP-3	Inibidor da metaloproteinase 3 (<i>Metalloproteinase inhibitor 3</i>)
UTR	Região não codificante do RNA mensageiro (<i>UnTranslated Region</i>)
VGM	Volume globular médio

1. Capítulo 1 - Introdução

As hemoglobinopatias são consideradas uma das doenças hereditárias monogênicas mais comuns no mundo, estimando-se que cerca de 90% dos recém-nascidos em países de baixo e médio rendimento sejam por estas afetados^{1,2}. Os dados existentes apontam a β -talassemia e a doença falciforme como as hemoglobinopatias mais frequentes¹.

A β -talassemia engloba desordens na cadeia β da hemoglobina (Hb) que podem causar diminuição da sua síntese³, resultando na acumulação de cadeiras α ⁴. Já a doença falciforme (DF) acontece por mutação na posição 6 do gene da β -globina (na qual o aminoácido ácido glutâmico é substituído por uma valina), resultado na formação de uma Hb anormal denominada de HbS⁴. A HbS irá polimerizar perante hipóxia, deformando a membrana eritrocitária que se adapta e toma uma forma anormal denominada de célula falciforme⁴.

A hemoglobina fetal (HbF) é predominante durante a vida fetal e após o nascimento, a sua quantidade fisiológica decresce até atingir cerca de 1% após 6 meses e a partir dos quais, a hemoglobina adulta (HbA) se torna maioritária durante a restante vida⁵. No entanto, uma terapêutica nestas situações consiste em induzir a expressão de HbF, uma vez que a sua persistência hereditária em situações de doença falciforme permite aumentar a sua quantidade em circulação, diminuindo a HbS anormal presente e as consequências desta hemoglobinopatia⁶.

A hidroxiureia (ou hidroxycarbamida ou HU) é um fármaco indutor da expressão de HbF, por aumento da expressão do gene da γ -globina, reduzindo o número e severidade das crises decorrentes^{7,8}.

Apesar da sua aplicabilidade clínica, a HU tem diversas desvantagens, como a extensa mielosupressão⁹ e potencial carcinogénico^{10,11}. Apresenta ainda efeitos teratogénicos no desenvolvimento embrionário em ratinhos, pelo que o seu uso é desaconselhado em gestantes¹² e tem limitada aplicação em países em desenvolvimento pela inexistência de recursos¹³.

Devido aos efeitos prejudiciais e dificuldade do uso em países subdesenvolvidos que a HU apresenta, torna-se importante disponibilizar outros compostos que atuem como indutores da expressão de HbF e apresentem menor toxicidade e facilidade de aquisição.

Atualmente, sabe-se que existem compostos obtidos na alimentação que afetam significativamente a expressão génica, de RNA mensageiro (mRNA) e proteínas¹⁴.

A genisteína (GN) é um composto natural presente em grandes quantidades em derivados da soja¹⁵. É um composto usado para terapêutica carcinogénica atuando como indutor da apoptose, inibidor da angiogénese e da metastização¹⁶. Mais ainda, a nível epigenético, foi

associado à diminuição da metilação das regiões promotoras de genes supressores de tumor previamente hipermetilados (logo silenciados) em células humanas de cancro hepatocelular¹⁷ e da mama¹⁸.

Já a epigallocatequina-3-galato (EGCG) é o principal composto polifenol presente no chá verde, por sua vez associado a ações protetoras no organismo humano (anti-inflamatória e anti-oxidante)¹⁹. Este é anticancerígeno¹⁹ e reconhecido como modulador epigenético, diminuindo a atividade enzimática das DNA metiltransferases (DNMT) e como tal, reativando a expressão de genes supressores de tumor previamente silenciados em células de cancro cervical²⁰ e da pele²¹.

Um estudo recente demonstrou que a EGCG e a GN atuam sem efeitos citotóxicos em células K562, diminuindo a expressão do gene regulador *BCL11A*, um supressor da γ -globina²². Assim sendo, estes compostos naturais apresentam potencial indutor da expressão de HbF e podem representar uma futura alternativa profilática para as hemoglobinopatias²².

Apesar de serem reconhecidos moduladores epigenéticos, o mencionado estudo não verificou qual a possível modulação epigenética de cada um destes compostos no seu potencial indutor da HbF, sendo esse o objetivo deste trabalho.

1.1. Questão de investigação

“Poderão a EGCG e GN atuar a nível epigenético como potenciais indutores da HbF?”

1.2. Objetivos

1.2.1. Geral

Avaliar a modulação epigenética da EGCG e GN na reativação transcricional da γ -globina e indução de HbF.

1.2.2. Específicos

- 1) Avaliar os efeitos da EGCG e GN na expressão génica de modeladores epigenéticos (DNA metiltransferases – *DNMT* e histonas desacetilases – *HDAC*) em células K562, através do qRT-PCR;
- 2) Avaliar o efeito da HU na expressão génica de modeladores epigenéticos (*DNMT* e *HDAC*) em células K562, através do qRT-PCR;
- 3) Comparar os resultados de expressão génica de moduladores epigenéticos obtidos individualmente com a EGCG e GN com resultados previamente reportados nas mesmas células K562 para expressão dos genes da α -globina (*HBA1*), β -globina (*HBB*), γ -globina (*HBG1* e *HBG2*) e nos reguladores da HbF (*BCL11A*, *MYB*, *KLF1* e *BGLT3*).

2. Capítulo 2 – Revisão da literatura

2.1. Hemoglobina humana

A hemoglobina (Hb) é um tetrâmero composto por quatro subunidades polipeptídicas denominadas de globinas e 4 grupos heme que interagem com os resíduos de histidina presentes nas primeiras (figura 2.1). Os grupos heme permitem o transporte de oxigênio e são compostos por um elemento central – o ferro II (Fe^{2+}) – e por protoporfirinas²³.

Nos humanos, existem dois *loci* diretamente relacionados com a síntese das globinas (figura 2.1 - A): o locus α , no cromossoma 16, que contém 3 genes diferentes - *HBZ* (ζ), *HBA1* (α_1) e *HBA2* (α_2) – e o locus β , no cromossoma 11, com 5 genes distintos – *HBE1* (ϵ), *HBG1* (γ_A), *HBG2* (γ_G), *HBD* (δ) e *HBB* (β)⁸. Na extremidade 5' do locus β , a montante do gene *HBE1*, encontra-se ainda uma região denominada de *locus control region* (ou LCR). Esta foi inicialmente identificada em ratos transgênicos devido ao silenciamento de todo este locus como consequência de uma deleção nesta região gênica²⁴. É apontada como específica de toda a linhagem eritrocitária, tratando-se de uma zona dominante no controlo e eficiência do início da transcrição gênica²⁴.

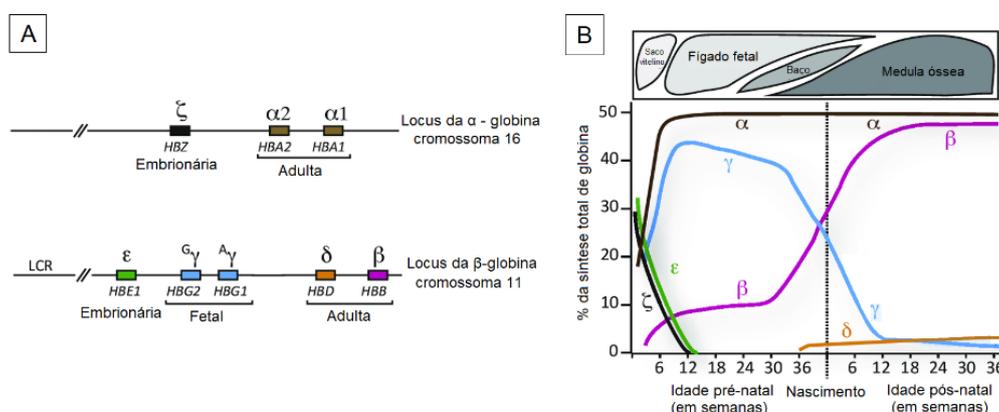


Figura 2.1 - (A) Desenvolvimento humano (em semanas pré e pós-nascimento) e expressão das cadeias de globina (em % de síntese total), conforme o local humano. (B) Constituição gênica dos loci α (cromossoma 16) e β (cromossoma 11). Adaptado de: Wienert B, Martyn G, Funnell A, Quinlan K, Crossley M. Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for β -Hemoglobinopathies. Trends Genet. 2018;34. doi: 10.1016/j.tig.2018.09.004.

O LCR atua de forma dinâmica na transcrição gênica das globinas, ganhando proximidade com o respectivo gene que deve ser expresso durante determinada fase de desenvolvimento humano²⁵. Mais ainda, os fatores regulatórios positivos (“ativadores”) ou negativos (“repressores”) vão ligar-se especificamente à região promotora dos genes da globina, competindo entre si para interagir com a LCR e conseguindo assim, diferente dominância das Hb’s ao longo da vida humana²⁵.

Todos os genes mencionados encontram-se organizados espacialmente de forma paralela para que aconteça a sua expressão sequencial nas células eritrocitárias com o decorrer do tempo²⁶. Assim, graças a fatores transcricionais (mais à frente mencionados) e à LCR, prevalecem ao longo do desenvolvimento humano distintas moléculas de Hb devido à regulação da expressão de determinados genes que compõem o locus β (figura 2.1 - B)⁵.

Durante a fase embrionária (primeiro trimestre após fecundação) as células eritrocitárias a diferenciarem-se no saco vitelino expressam os genes *HBZ* (locus α) e *HBE1* (locus β), formando a Hb embrionária que é composta pelas globinas ζ e ϵ ^{27,28}.

Após esta etapa, quando se inicia a hematopoiese fetal no fígado, o gene da γ -globina (*HBG1* e *HBG2*) começa a ser expresso conjuntamente com o da α -globina (*HBA*) para formar a Hb fetal (HbF ou $\alpha_2\gamma_2$)²⁷. Na altura do nascimento, a hematopoiese passa a ser realizada na medula óssea e vão passar, gradualmente, a exprimir-se os genes da α -globina e β -globina (*HBB*) - formando a Hb adulta (HbA - $\alpha_2\beta_2$) - e ainda o gene da δ -globina (*HBD*) - formando a Hb adulta *minor* ou *A₂* (HbA₂ - $\alpha_2\delta_2$)²⁷.

A quantidade de HbF decai até dois anos após o nascimento, estabelecendo-se o normal perfil de um adulto com a HbA como a Hb mais abundante, seguindo-se a HbA₂ (com 2,5 a 3,5%) e por fim, a HbF em níveis abaixo de 1%⁸.

2.2. Regulação da expressão de hemoglobina

À mudança de expressão de HbF para HbA que decorre ao longo da vida humana dá-se o nome de *HbF switch*, uma vez que as quantidades maioritárias de Hb eritrocitária se invertem após o nascimento. Na etiologia deste fenómeno fisiológico encontram-se diversos mecanismos moleculares que permitem regular a expressão da HbF e assim, diminuindo-a após o nascimento de forma gradual para aumentar a expressão de HbA.

A identificação de todos os mecanismos moleculares implicados no *HbF switch* permitem reconhecer alvos mais específicos e eficazes para induzir a expressão desta Hb em doentes com patologias que afetem as suas normais quantidades presentes no organismo⁵.

De forma geral, as principais regiões reguladoras da expressão de HbF identificadas em humanos cuja variação genética influencia a normal mudança na expressão molecular de HbF para a HbA decorrente no desenvolvimento humano, são o *B Cell Lymphoma 11A (BCL11A)* e *HBSL-1-MYB*. Um estudo de 2010 atribui cerca de 40% a 50% da diferença inter-individual na expressão fenotípica de HbF como resultado de variantes genéticas hereditárias nestes 2 genes, salientando a sua importância na regulação transcricional da Hb humana²⁹.

No entanto, existem ainda outros reguladores transcricionais que se estipula estarem implicados no fenómeno de *HbF switch* tais como o mais recentemente identificado, *BGLT3* (figura 2.2). Os mecanismos epigenéticos podem igualmente alterar a expressão das Hbs, tais como a metilação do DNA e acetilação das histonas.

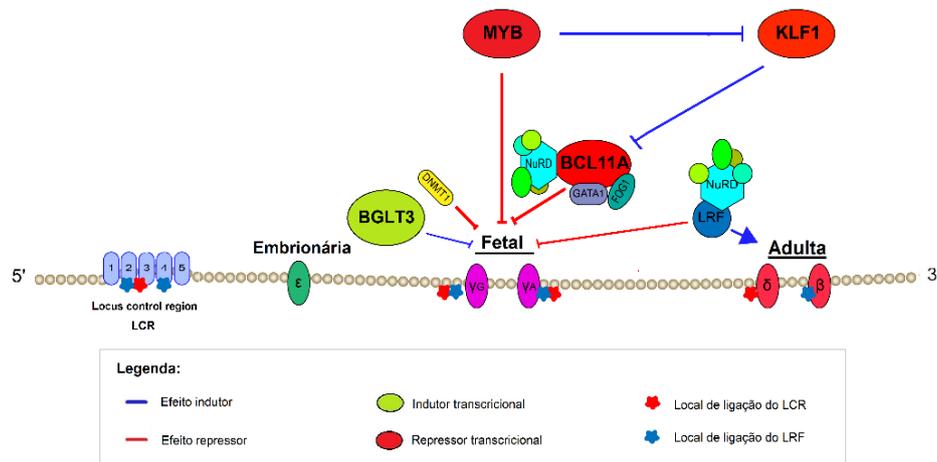


Figura 2.2 – Reguladores da expressão de hemoglobina e a sua interação com os genes das globinas presentes no cromossoma 11. Adaptado de: Paikari A, Sheehan V. Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2017;180. doi:10.1111/bjh.15021.

2.2.1. BCL11A

O primeiro locus genómico identificado como regulador dos níveis de HbF foi uma região do cromossoma 2 incluída no gene *BCL11A*, graças a GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) que analisaram a presença de variantes genéticas em indivíduos com diferentes níveis de expressão desta Hb^{30,31}, levando à hipótese de que este gene seria um regulador da expressão de HbF.

De facto, um estudo posterior demonstrou que os níveis de expressão da proteína BCL11A estariam correlacionados com o desenvolvimento eritrocitário, uma vez que as células eritrocitárias produzidas no fígado fetal estariam não apenas associadas a grande expressão da γ -globina (e consequente HbF), mas também a uma baixa expressão de formas proteicas completas de BCL11A, sugerindo assim o seu papel como repressor da expressão do gene da γ -globina³². Esta hipótese veio a ser apoiada ao fazer uso de shRNA (*short hairpin RNA*) para realizar o *knockdown* do *BCL11A* em culturas de células progenitoras eritrocitárias, conseguindo-se induzir a expressão de HbF de forma diretamente proporcional à extensão da depleção nos níveis de mRNA deste gene³². Assim, foi extrapolado que isoformas proteicas completas de BCL11A estariam presentes em células eritrocitárias humanas de adultos, associadas a baixos níveis de HbF.

Mais ainda, os dados obtidos transmitem que o fator *zinc-finger* BCL11A (resultante da transcrição do mencionado gene) funciona em associação física aos fatores de transcrição GATA1 e FOG1 e ao complexo repressor e remodelador de cromatina Mi2/NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylase*)³². Do complexo NuRD fazem parte as HDAC (histonas desacetilases) 1 e 2 que mais tarde, foram implicadas na indução da HbF através da sua inibição terapêutica³³.

Num estudo subsequente, a inativação deste gene em ratinhos com DF demonstrou induzir a expressão do gene *HBG* e ser suficiente para melhorar os parâmetros hematológicos e clínicos, sem afetar a eritropoiese *in vivo* apesar da extensa depleção do *BCL11A*³⁴. Com este estudo, não apenas se evidenciou a importância deste gene no controlo da regulação de γ -globina, mas também como potencial alvo terapêutico na indução de HbF sem perturbação da eritropoiese.

2.2.2. KLF1 ou EKLF

Após os estudos iniciais ao gene *BCL11A*, é descoberto que um fator eritrocitário específico denominado *Kruppel Like Factor 1* (KLF1 ou EKLF) atua através de ações diretas e indiretas para controlar a expressão de HbF⁸. Foi inicialmente demonstrado ter um papel crítico no *HbF switch* pois atua como ativador transcricional do gene *HBB* ao interagir com uma secção conservada da região promotora deste gene, a zona CACCCC, que está implicada na etiologia da β -talassémia em humanos³⁵.

Num estudo de 2010, demonstrou-se que ratinhos com alelo hipomórfico de *KLF1* possuem diminuição do nível de mRNA e proteínas do gene *BCL11A* e persistência na expressão de γ -globina³⁶. Adicionalmente, ao realizar o *knockdown* do *KLF1*, verificou-se uma diminuição acentuada na expressão do gene *BCL11A* e aumento da expressão do gene da γ -globina³⁶. Este atua assim, por interação direta com a região promotora do gene da β -globina (ativando a sua expressão) e por ação indireta pois interage com a região promotora do gene *BCL11A*, induzindo a expressão deste silenciador de γ -globina (fator transcricional positivo do *BCL11A*)³⁶.

De uma família de 20 membros, 11 possuíam fenótipo de Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF), uma doença genética benigna na qual os níveis fisiológicos de HbF se mantêm elevados durante a vida adulta ($> 2\%$)³⁷. Em todos os membros foi realizado estudo de polimorfismos genómicos, identificando-se uma mutação *nonsense* no gene *KLF1* exclusiva nos 11 indivíduos doentes e que elimina a zona de ligação da proteína ao DNA³⁷. Nestes indivíduos, o PCR evidenciou diminuição do mRNA do gene *BCL11A* e o aumento da expressão dos genes *HBG1* e *HBG2*, apoiando assim, respetivamente, a hipótese de que o KLF1 atua como ativador transcricional do *BCL11A* e inibidor transcricional da γ -globina³⁷. Pode então considerar-se a mitigação farmacológica da expressão de KLF1 como um método de indução da expressão de HbF em adultos com β -talassémia ou DF³⁶. No entanto, diferentes mutações neste gene estão associadas a diferentes níveis de aumento da HbF, não se verificando consistência nesta indução em variantes semelhantes³⁸. A base desta variação não está totalmente definida e será importante entender de forma mais específica o impacto do uso deste fator como alvo terapêutico na indução de HbF pois pode ocorrer, de forma imprevisível, a perturbação da eritropoiese individual⁸.

2.2.3. HBSL-1-MYB (HMIP)

De forma semelhante ao BCL11A, os GWAS identificaram uma zona intergênica denominada *HMIP* no braço longo do cromossoma 6 (6q23) entre os genes *HBS1L* e *MYB* com variantes associadas a diferentes níveis de HbF em humanos³⁹.

O gene *HBS1L* é considerado um gene *housekeeping*, enquanto o gene *MYB* possui uma localização e função mais restrita, sendo crucial para a correta maturação eritrocitária⁴⁰. A sobreexpressão do gene *HBS1L* não aparenta afetar a expressão de γ -globina em células K562, mas a sobreexpressão do *MYB* diminuiu o nível proteico celular desta globina⁴¹.

Mais ainda, culturas de progenitores eritrocitários humanos com altos níveis de γ -globina e de HbF estavam associadas a menor expressão de *MYB* que por sua vez, causava baixa expansão celular e acelerada maturação eritrocitária, sugerindo assim que este gene não atua apenas como supressor da HbF, mas também como regulador do desenvolvimento eritrocitário⁴¹.

É proposto que o MYB atue por dois mecanismos⁸ – o direto (no qual ativa a transcrição do fator KLF1 e assim, suprime a HbF) e indireto (por alteração da velocidade de diferenciação eritrocitária, sendo que baixos níveis deste existem em progenitores eritrocitários primitivos com maior capacidade de maturação). Este é um eventual alvo profilático nas hemoglobinopatias, mas pode implicar efeitos desconhecidos na eritropoiese⁵.

2.2.4. BGLT3

Mais recentemente, foi descoberto um novo *locus* denominado *BGLT3* (*Beta Globin Locus Transcript 3*) que se encontra numa região intergênica no cromossoma 11, a jusante do pseudogene *HBBP1* e a montante do gene *HBG1*. Este é transcrito unidireccionalmente na mesma cadeia que o gene da β -globina e origina um *long non coding RNA* (lncRNA) com função potenciadora na expressão da HbF⁴². Quando ao *BGLT3*, foi provado que é co-transcrito, de forma independente, com os genes da γ -globina durante a maturação eritrocitária *in vivo* (em células eritrocitárias humanas) e *in vitro* (células K562)⁴².

Adicionalmente, tanto o locus como o transcrito estão associados positivamente à expressão da γ -globina através de funções distintas^{42,43}.

A deleção deste locus por tecnologia *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) em células K562 associou-se especificamente a uma diminuição transcricional da γ -globina (por redução do recrutamento da RNA polimerase para a sua região promotora)⁴². No entanto, uma aumento do transcrito BGLT3 (lncRNA) foi insuficiente para aumentar os níveis de transcrição da γ -globina ao nível dos reportados para o gene. Propõe-se assim que o transcrito BGLT3 seja também um regulador positivo da γ -globina,

mas insuficiente para aumentar a transcrição de HbF sem que esteja presente o respetivo locus⁴².

Em suma, é proposto que o locus *BGLT3* preserve o estado ativo da transcrição dos genes da γ -globina (aproximação física por *looping*) e o lncRNA atue no recrutamento e estabilização de co-reguladores transcricionais⁴³.

2.2.5. Regulação epigenética

A diferente expressão das globinas que ocorrem ao longo da vida também se deve, em parte, a alterações epigenéticas que são reversíveis e não alteram a sequência nucleotídica dos referidos genes (genótipo), provocando ativação ou repressão da sua expressão (modificações fenotípicas)⁴⁴. São exemplos base da regulação epigenética da expressão das Hb a metilação do DNA e acetilação das histonas⁴⁴.

2.2.5.1. Metilação do DNA

A metilação do DNA é realizada por um complexo de enzimas na extremidade 5' (região promotora) de resíduos citosina em dinucleótidos Citosina-fosfato-Guanina (CpG) - as DNA metiltransferases (DNMT)⁴⁵. Nos mamíferos, existem 3 principais DNMT que demonstram atividade biológica significativa – as DNMT1, DNMT3A e DNMT3B⁴⁵. Estas apresentam diferenças funcionais entre si, sendo a DNMT1 considerada uma metilase de manutenção pois adiciona um grupo metil à ilha CpG numa cadeia de DNA após a sua replicação, garantindo a sua simetria com a cadeia inicialmente replicada⁴⁶. Já as DNMT3A e DNMT3B são consideradas metilases *de novo* pois adicionam, de forma simétrica, um grupo metil a duas cadeias de DNA previamente desmetiladas⁴⁶.

Geralmente, genes que contêm sequências das ilhas CpG hipermetiladas encontram-se num estado transcricional inativo ou reprimido, enquanto que genes com ilhas CpG hipometiladas estejam ativos do ponto de vista transcricional⁴⁴. Assim, a metilação do DNA é vista como um mecanismo repressor transcricional e a desmetilação como um evento ativador da transcrição. Tendo esta informação por base, é reportado que durante o desenvolvimento fetal a região promotora do gene da γ -globina esteja hipometilada (logo a ser transcrita), enquanto o promotor da β -globina esteja hipermetilado (logo silenciado)⁴⁷. Por outro lado, durante a vida adulta, estas metilações invertem-se para que exista pouca transcrição do gene da γ -globina (e conseqüente diminuição da expressão da HbF), enquanto aumenta a quantidade de HbA expressa por aumento transcricional da β -globina⁴⁷.

A DNMT1 foi diretamente implicada no *HbF switch*, fazendo parte do complexo NuRD que interage diretamente com a proteína repressora BCL11A e como tal, funciona como supressora da HbF⁴⁸. A DNMT3A foi também implicada como repressora dos genes da γ -globina, uma vez que o seu *knockdown* em células K562 leva a um aumento dos níveis de

expressão dos mencionados genes e diminuição da metilação das suas ilhas CpG, sem mudança epigenética no gene da β -globina⁴⁹.

2.2.5.2. Acetilação de histonas

A estrutura da cromatina pode ser influenciada através de modificações pós-transcricionais decorrentes na extremidade N-terminal das histonas (mais especificamente, na zonas ricas em resíduos de lisina), como é exemplo a metilação e a acetilação⁴⁴.

Em regra geral, a acetilação dos resíduos de lisina é realizada por enzimas denominadas histonas acetiltransferases (HAT) que promovem uma conformação mais aberta e acessível da cromatina, facilitando a transcrição génica⁴⁴. Por outro lado, a desacetilação destes resíduos (remoção do grupo acetil) é realizada pelas histonas desacetilases (HDAC) que promovem uma conformação mais fechada da cromatina (heterocromatina), reprimindo a expressão génica ao dificultarem o acesso da RNA polimerase^{44,50}.

Existem, essencialmente, 3 classes de HDAC conforme a conservação do seu domínio catalítico e a dependência de co-fatores⁵⁰. A classe I das HDAC é mais essencial relativamente às restantes, sendo compostas pelas HDAC 1, 2, 3 e 8 que possuem um domínio de desacetilase inteiramente conservado, são expressas ubiquitivamente em diversos organismos e tecidos celulares e predominam no núcleo (onde assumem forte atividade para com as histonas nucleares)⁵⁰.

As HDAC 1 e 2 associam-se ao complexo NuRD (diretamente implicado no *HbF switch*), a HDAC3 complexa-se com a proteína ativadora do NCoR (*Nuclear receptor corepressor*), enquanto que a HDAC8 atua de forma não complexada. As HDAC 1 e 2 foram apontadas como repressoras da expressão da globina fetal³³. Já a HDAC3 foi também implicada no *HbF switch*, uma vez que o seu *knockdown* por siRNA (após 48 horas) foi suficiente para aumentar significativamente a transcrição do gene da γ -globina⁵¹.

2.3. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias englobam todas as doenças genéticas que ocorrem na Hb humana³. São consideradas uma das doenças hereditárias monogénicas mais comuns no mundo com transmissão autossómica recessiva e que cerca de 90% dos recém-nascidos em países de baixo e médio rendimento sejam por estas afetados^{1,2}. Estima-se ainda que cerca de 7% da população mundial seja portadora de uma das mutações que as originam⁵².

De forma simplista, as hemoglobinopatias podem ser divididas em dois grandes grupos conforme a alteração presente, apesar de ambos terem etiologia em mutações e/ou deleções nos genes da α ou β -globina³ – os síndromes talassémicos ou talassémias (α ou β -talassémias, conforme a Hb afetada quantitativamente) e as variantes estruturais da Hb (sendo as mais relevantes a HbS, Hb E e Hb C). O seu diagnóstico laboratorial (figura 2.3) é

realizado, em primeira instância, através do historial médico, seguido da contagem de eritrócitos com os respetivos índices hematimétricos (VGM – Volume globular médio e HGM – Hb globular média, geralmente diminuídos nestas patologias), observação microscópica do esfregaço sanguíneo e por fim, com testes de confirmação para as Hb (como a eletroforese ou a cromatografia líquida de alta performance ou HPLC) que podem, em última linha, ser complementados com testes moleculares mais específicos para deteção de eventuais mutações presentes nos genes das globinas^{3,53}.

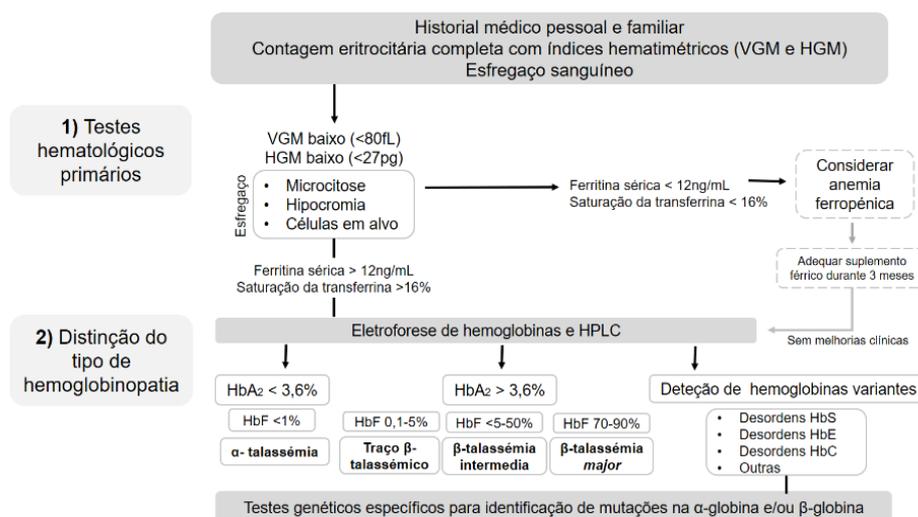


Figura 2.3 - Algoritmo de diagnóstico das hemoglobinopatias. Adaptado de: Hempe JM, Craver RD. Laboratory diagnosis of structural hemoglobinopathies and thalassemias by capillary isoelectric focusing. *Methods Mol Med.* 1999;27:81-98. doi:10.1385/1-59259-689-4:81; Brancaleoni, V., Di Pierro, E., Motta, I., & Cappellini, M. D. (2016). Laboratory diagnosis of thalassemia. *International Journal of Laboratory Hematology*, 32–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijlh.12527>.

2.3.1. Beta-talassémia

Os dados existentes apontam a β -talassémia e a DF como as hemoglobinopatias mais frequentes¹. As β -talassémias resultam de uma ou mais mutações no gene da β -globina que levam a uma produção insuficiente (β^+) ou ausente (β^0) desta cadeias de globina^{3,54}. A diminuição da quantidade fisiológica das cadeias β presente no organismo causa uma diminuição da HbA ($\alpha_2\beta_2$) que, por sua vez, leva a um aumento compensatório da produção das restantes globinas não afetadas e amplifica-se a quantidade da HbA₂. As cadeias de globina em excesso são instáveis pelo que vão precipitar intracelularmente causando hemólise, destruição prematura dos percursores eritrocitários imaturos na medula óssea e diminuição do tempo de semi-vida dos eritrócitos em circulação⁵⁴.

A sua base etiológica e molecular é heterogénea, existindo mais de 500 mutações reportadas, até à data, na base de dados das variantes das Hb e talassémias (<https://globin.cse.psu.edu/>). Grande parte das mutações que estão na sua origem é do tipo *frameshift* devido à inserção de um nucleótido na sequência de DNA, interferindo com a grelha de leitura do gene da β -

globina e podendo alterar o processamento do transcrito primário, da tradução do mRNA ou a estabilidade pós-transcricional do produto deste gene⁵⁵.

Conforme as manifestações clínicas, as β -talassémias podem ser divididas em 3 tipos, com crescente severidade – *minor* (traço β -talassémico), intermédia e *major* (também conhecida como anemia de Cooley ou anemia Mediterrânea)^{55,56}.

A talassémia *major* acontece por heterozigotia composta ou mutação homozigótica para o gene desta globina e requer constante acompanhamento médico a longo prazo, para a realização de transfusões sanguíneas que amenizem a anemia severa normalmente manifestada nos primeiros 2 anos de vida destes doentes (acompanhada de um crescimento retardado e anormalidades esqueléticas)^{54,55}. A β -talassémia intermédia é considerado um fenótipo clínico menos comum e com sintomatologia entre a *major* e *minor*⁵⁶. Já a β -talassémia *minor* está normalmente associada a portadores silenciosos que são assintomáticos (podem ter discreta anemia), resultando apenas da herança de um único gene mutante (heterozigotia)^{56,57}. Apesar da menor severidade clínica associada à talassémia intermédia e *minor*, com o avançar da idade, até os pacientes com menor severidade da doença podem apresentar sérias complicações como osteopênia, excesso de ferro tecidual e expansão anormal da medula óssea⁵⁵.

Mais de 90% das pessoas com β -talassémia vive em países de baixo ou médio rendimento, prevendo-se um aumento da sua incidência nos próximos anos uma vez que a mortalidade infantil por doenças infecciosas e desnutrição tende a diminuir com a melhoria do sistema de saúde público⁵⁷.

Em países em desenvolvimento, as mencionadas manifestações são bastante frequentes de serem encontradas em pacientes com talassémia *major* não tratada devido à falta de programas médicos para suporte transfusional de longo termo⁵⁵.

2.3.2. Doença falciforme

O termo “doença falciforme” (ou DF) define um grupo de desordens hematológicas hereditárias caracterizadas por mutações no gene *HBB* que codifica a subunidade β da Hb humana e que resultam numa variante estrutural da HbA normal, a denominada hemoglobina S (HbS) ou falciforme⁵⁸.

A etiologia DF reside numa mutação no 17º nucleótido do gene da β -globina, na qual uma timina é substituído por uma adenina (GTG → GAG)⁷¹. Com esta mudança no codão, o sexto aminoácido da proteína (ácido glutâmico) resultante é substituído por uma valina, resultado na formação de uma Hb com sequência proteica anormal denominada de HbS^{4,58}.

A mutação causa uma perda de carga negativa e ganho de hidrofobicidade da β -globina que estimula ligações entre as cadeias β_1 e β_2 de duas moléculas de Hb adjacentes. Esta polimerização irá formar um núcleo cristalizado que preenche o eritrócito, interrompendo a

sua normal flexibilidade e estrutura membranar⁷¹. Perante um estado de hipóxia, a HbS polimeriza deformando a membrana eritrocitária que se adapta e toma uma forma anormal denominada de célula falciforme⁴.

O termo “DF” engloba o estado homozigótico da DF ou também denominada drepanocitose (HbSS por herança de duas cópias da variante S de ambos os progenitores – a forma da doença mais comum e grave) e outros estados heterozigóticos (por exemplo, a indivíduos HbAS ou com traço falciforme que apenas possuem uma cópia da variante S)^{3,58}.

Apesar de os estados heterozigóticos não estarem normalmente associados a manifestações clínicas, a drepanocitose está associada a diversas complicações como hemólise crónica, crises agudas vaso-oclusivas (ou crises falciformes) e danos orgânicos progressivos devido à falta de oxigénio (no fígado, baço, rins e sistema nervoso)^{3,4}. As crises no baço (por destruição massiva nos eritrócitos anormais que levam, frequentemente, à realização de esplenectomia) e os enfartes (pela hipoxia tecidual) podem também aumentar o risco de morte³.

A reação de falciformação eritrocitária é reversível após reoxigenação da Hb⁵⁹. No entanto, ciclos repetidos de polimerização vão danificar permanentemente a membrana eritrocitária causando a destruição prematura das células defeituosas (cujo tempo de semi-vida é de 10 a 20 dias em vez dos normais 120 dias e a sua remoção da circulação pode acontecer nalgumas horas), levando a uma situação de anemia hemolítica crónica⁵⁹.

Contudo, a anemia não é a principal causa de morbilidade em doentes falciformes e sim a vaso-oclusão⁵⁹. As células falciformes são desidratadas, rígidas e tem apetência para a hemólise pelo que vão aumentar a viscosidade sanguínea e obstruir microvasos, causando hipoxia tecidual e conseqüente necrose⁵⁹. Os episódios agudos de vaso-oclusão englobam as duas maiores causas de morte, as crises vaso-oclusivas (nos vasos da medula óssea) e o síndrome torácico agudo (afeta a vasculatura pulmonar)⁵⁹. As crises agudas podem começar tão precocemente como os 6 a 9 meses de idade e continuar até à vida adulta⁵⁸.

Devido a todas as conseqüências patológicas, a drepanocitose ou HbSS é considerada a mais perigosa das hemoglobinopatias³.

De todos os casos de DF, 70% acontecem em populações africanas, estimando-se que 50 a 90% de todas as crianças doentes morram nos primeiros 5 anos da sua vida sem diagnóstico estabelecido⁶⁰. Um estudo de 2013 reporta que, todos os anos e mundialmente, existem mais de 300.000 bebés que nascem com drepanocitose e este número deverá aumentar até 2050, ultrapassando os 400.000 recém-nascidos doentes, destacando assim a importância do seu diagnóstico precoce e em conseguir alternativas terapêuticas viáveis⁶¹.

2.4. Terapêuticas

Apesar de possuírem diferente etiologia, tanto a DF como a β -talassémia possuem semelhantes métodos de tratamento (figura 2.4). Estes são bastante limitados em países de

baixo rendimento (locais associados a maior prevalência destas patologias), onde a sua gestão começa muito antes do aparecimento da sintomatologia, devendo estabelecer-se um diagnóstico precoce nos recém-nascidos para que sejam evitadas possíveis complicações como infeções⁶².

Grande parte destes doentes tem de ser submetidos a um cuidado paliativo a longo termo, recaindo a principal opção às transfusões de concentrados eritrocitários associando-se a quelantes de ferro e a esplenectomia (remoção do baço para diminuir a destruição eritrocitária)⁶².

Atualmente, existe ainda uma estratégia promissora no tratamento das hemoglobinopatias, a reativação farmacológica da HbF⁶³. Até à data, apenas alguns fármacos foram aprovados pela Agência Europeia do Medicamento para uso exclusivo do tratamento da DF – a hidroxiureia ou HU (atualmente conhecido na Europa como Xromi ou Siklos, um indutor farmacológico da HbF) e o Adakveo (solução para administração intravenosa que recebeu, a 28 Outubro de 2020, uma autorização condicional para uso em adultos drepanócitos acima dos 16 anos, estando sob monitorização adicional para garantir segurança na sua administração)⁶⁴. O seu composto do Adakveo é o *Crizanlizumab*, um anticorpo monoclonal dirigido contra a P-seletina, uma proteína que ao ser bloqueada deixará de promover a agregação das células falciformes à parede dos vasos sanguíneos, evitando a sua oclusão⁶⁴.

A L-glutamina (comercialmente denominado de Xindari) não possui, à presente data, autorização para venda na União Europeia por falta de ensaios clínicos que testem a sua eficácia⁶⁵. É um anti-oxidante, permitindo que os eritrócitos fiquem mais flexíveis⁶⁵.



Figura 2.4 - Terapêuticas para o tratamentos das β -hemoglobinopatias. Adaptado de: Dreuzy E, Bhukhai K, Leboulch P, Payen E. Current and future alternative therapies for beta-thalassemia major. *Biomed J.* 2016;39(1):24-38. doi:10.1016/j.bj.2015.10.001. Legenda: CHE - Células Hematopoiéticas Estaminais.

2.4.1. Transfusões sanguíneas

Indivíduos com β -talassémia ou DF são frequentemente submetidos a transfusões eritrocitárias, podendo começar antes do primeiro ano de vida e estimando-se que cerca de

90% de todos os pacientes sejam submetidos a, pelo menos, uma transfusão durante toda a sua vida⁶².

A presença de sintomas clínicos severos (derivados da anemia crónica) são impulsionadores na decisão médica para iniciar um regime transfusional que melhore a qualidade de vida do paciente⁵⁵. Quando realizada de forma regular, a transfusão sanguínea propõe repor o normal nível de Hb sanguíneo para garantir suficiente oxigenação tecidual⁶⁶.

Contudo, as transfusões sanguíneas podem, ao fim de um ano de uso constante, causar um excesso de ferro que irá causar dano tecidual oxidativo em órgãos essenciais como o fígado, pelo que o uso de quelantes de ferro é aconselhado para prevenir a sua acumulação (hemossiderose) e a disfunção orgânica progressiva⁵⁵.

As transfusões recorrentes podem expor o paciente a diferentes tipos de antigénios presentes no sangue, aumentando o risco de aloimunização⁶². São de complicada concretização em países em desenvolvimento devido ao seu custo, mas também pelas doenças transmitidas por via hemática (ex. hepatite B e C) que ocorrem com bastante frequência nestes países⁶².

2.4.2. Transplante de células estaminais hematopoiéticas

O transplante de células estaminais hematopoiéticas (CEH) derivadas da medula óssea (MO) ou de outras fontes (cordão ou sangue periférico) é a única cura definitiva para doentes com hemoglobinopatias. Este consiste numa terapia de substituição de todas as células hematopoiéticas que vai eliminar a eritropoiese ineficaz e possibilita que o corpo produza células eritrocitárias não patológicas⁶².

Doentes com menos de 17 anos não possuem normalmente associados fatores de risco (presença de hepatomegália, extensão da fibrose hepática e a magnitude da acumulação de ferro) podem ser submetidos à transfusão de CEH quando verificada a compatibilidade dador-recetor, conseguindo-se elevada taxa de cura (superior a 90%)⁶⁷.

Uma das principais limitações deste tratamento consiste na compatibilidade HLA (*Human Leukocyte Antigen*), uma vez que existem um número limitado de dadores gémeos que sejam idênticos e o transplante não compatível foi concretizado um número limitado de vezes⁶³.

2.4.3. Reativação da hemoglobina fetal

Em 1948, verificou-se que bebés com DF entre os 6 e 12 meses pós-parto tinham menor severidade clínica desta patologia relativamente a crianças com idade superior⁶⁸. Os seus eritrócitos requerem mais tempo para completar o processo de falciformação, bem como uma tensão de oxigénio mais baixa relativamente a adultos para tal fenómeno ocorrer. Foi colocada a hipótese de que uma quantidade maioritária de HbF presente durante o primeiro ano de vida de crianças com DF permitia um estado assintomático, até a sua quantidade decair de forma fisiológica⁶⁸.

Mais tarde, esta hipótese veio a ser apoiada por um diferente estudo no qual se verificou que pacientes com DF e fenótipo de PHHF (normalmente recorrente em populações de países como a Índia e Arábia Saudita) tinham maior chance de serem assintomáticos e terem um percurso clínico menos severo, atribuindo-se este fenómeno à produção exacerbada de HbF durante a idade adulta⁶⁹.

Assim, outra terapêutica promissora nas β -hemoglobinopatias consiste na indução farmacológica da HbF, uma vez que o seu aumento em situações de DF permite diminuir a HbS anormal circulante e tem potente efeito anti-falciforme nos eritrócitos, diminuindo as consequências desta hemoglobinopatia⁶. Para além do efeito benéfico na DF, foi também sugerido que até o seu nível fisiológico decair, pacientes com β -talassémias apresentam também evolução clínica menos relevante⁵.

Existem assim diversos compostos indutores da HbF, incluindo reguladores epigenéticos (inibidores das DNMT como a 5-azacitidina ou inibidores das HDAC como o ácido butírico) e compostos citotóxicos (como a hidroxureia ou HU).

2.4.3.1. Reguladores epigenéticos

O primeiro agente que demonstrou aumentar a expressão de γ -globina foi a 5-azacitidina. Esta é uma droga anti-neoplásica (síndromes mielodisplásicas) que reprime a metilação do DNA por inibição da enzima DNMT1, atuando como indutora transcricional dos genes da γ -globina (uma vez que estes estão normalmente hipermetilados logo silenciados durante a vida adulta^{5,70}). Esta demonstrou aumentar a expressão de HbF e reduzir as anormalidades celulares associadas em ensaios clínicos de pequena escala em doentes com DF e β -talassémia⁷¹.

Apesar da sua aplicabilidade, é um inibidor da fase S do ciclo celular pelo que não foi estabelecido se o seu mecanismo de reativação da transcrição da HbF fora diretamente através da desmetilação ou indiretamente por eritropoiese por stress⁷⁰. Não se chegaram assim, a realizar ensaios em larga escala devido ao risco de este ser um potencial mutagénico. Mais recentemente a decitabina, um metabolito da 5-azacitidina que não se incorpora no RNA e possui forte atividade inibitória da DNMT1 associado a menor citotoxicidade, demonstrou maior eficácia em aumentar a expressão de HbF quando usado em doses regulares, diminutas e intermitentes em adultos com DF e β -talassémia, inclusive quando estes não demonstram resposta à HU⁷¹. Características da DF como as crises vaso-oclusivas, adesão eritrocitária aos vasos e dano endotelial melhoraram significativamente⁷¹. No entanto, são necessários estudos de maior escala para testar a eficácia deste composto em hemoglobinopatias^{5,70}.

A observação de crianças com mães diabéticas demonstrou que existia um atraso no *HbF switch* devido a um aumento do ácido beta-hidroxibutírico que se encontra elevados nestas

gestantes^{5,70}. Como tal, foi considerado para ensaios clínicos de pequena escala um derivado do ácido butírico, o butirato de arginina. Este é um inibidor das HDAC que se demonstrou eficaz ao ser administrado em doentes com DF em regimes intermitentes e frequentes, em baixa dose (para evitar citotoxicidade), conseguindo aumentar a HbF e ainda diminuir o número de hospitalizações necessárias⁷². No entanto, a terapia não manteve consistência no seu desempenho em ensaios de maior dimensão e a sua dificuldade de administração não permitiu que se desenvolvesse o seu uso clínico^{5,63,70}.

Para além das limitações mencionadas, estes inibidores das DNMT e das HDAC são administrados exclusivamente por via intravenosa e os últimos necessitam de doses elevadas para atuar pois sofrem um rápido metabolismo, tornando-se estas características desvantagens para permitir o seu uso clínico disseminado⁷⁰.

2.4.3.2. Hidroxiureia

O único fármaco indutor da HbF aplicado em doentes falciformes com uso aprovado desde 2007 pela Agência Europeia de Medicamentos é a hidroxycarbamida ou hidroxiureia (HU)⁸.

A HU é um agente citotóxico, inibidor da fase S do ciclo celular e ainda anti-neoplásico, aplicado no tratamento de doentes com desordens mieloproliferativas. É bastante usada na infeção pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida devido à sua capacidade citostática, na qual atua como inibidor da ribonucleotídeo redutase, uma enzima necessária para a correta síntese e reparação do DNA⁵.

Em indivíduos com DF a HU diminui a contagem total de leucócitos (prevenindo a sua ativação), reduz a incidência de crises vaso-oclusivas, a necessidade transfusional e mortalidade⁷³. Esta aumenta a produção de HbF, causa polimerização tardia da HbS, reduz a hemólise, aumenta a disponibilidade do ácido nítrico (com conseqüente diminuição da vasoconstrição, diminuição da ativação e adesão endotelial) e por fim, reduz a inflamação crónica⁷⁴. Apesar do uso exclusivamente aprovado para a DF, pacientes com β -talassémia podem vir a ser considerados para esta terapêutica pois demonstram ter menor severidade clínica relacionada com o aumento quantitativo de HbF provocado pela HU⁷⁵.

A eficácia da HU está comprovada na prevenção de crises agudas e conseqüentemente, na diminuição da necessidade de hospitalizações⁷⁶. A totalidade do seu mecanismo de atuação é desconhecido⁸, mas já foi revelado que atua por aumento da expressão do gene da γ -globina e também estimulando ligeiramente a gene da β -globina através da via p38 MAPK⁷. A exposição das células eritroleucémicas da linhagem celular K562 à HU resulta num aumento da Hb intracelular e nos níveis de mRNA da γ -globina⁷⁷. Em células de progenitores eritrocitários vai aumentar os níveis transcricionais da γ -globina e da HbF⁷⁷.

Apesar da aplicabilidade clínica, o uso da HU está associado a diversas desvantagens como o uso limitado em doentes de países em desenvolvimento pela inexistência de recursos

monetários e hospitalares que dificultam a sua aplicabilidade¹³. Ainda que a sua toma seja considerada segura, alguns pacientes não obtêm resposta benéfica devido a limitações na sua aquisição ou por resistência farmacológica⁷³.

Quanto a efeitos a longo prazo, pode ocorrer uma extensa mielosupressão que resulta em neutropenia, reduzindo a proteção imunológica do utente e que requer constante vigilância médica dos parâmetros hematológicos para reajuste da dose⁹. Mais ainda, a toma deste medicamento em adultos do sexo masculino com DF causou anormalidades no fluido seminal (motilidade e contagem de espermatozoides) tendo este normalizado 3 meses após a interrupção da sua toma⁷⁸. A HU é um potencial carcinogénico, podendo despoletar o desenvolvimento de carcinomas de células escamosas em utentes com idade avançada^{10,11}, e outras lesões como a gastrite⁷⁹, úlceras na mucosa oral⁷⁹ e pneumonia intersticial⁸⁰. Por último, o seu uso é desaconselhado nas gestantes pois apresenta potencial teratogénico, reportando-se anomalias no desenvolvimento embrionário em ratinhos¹².

2.5. Compostos naturais como moduladores epigenéticos

Atualmente, sabe-se que existem compostos obtidos na alimentação que afetam significativamente a expressão génica, de RNA mensageiro (mRNA) e proteínas¹⁴. Estes são extensivamente estudados para se entender o seu potencial impacto aquando consumidos pelo ser humano e a sua possível aplicabilidade no tratamento e prevenção de diversas patologias¹⁴.

2.5.1. Epigallocatequina-3-galato (EGCG)

O chá verde (*Camellia sinensis*) é cultivado em mais de 30 países no mundo e trata-se da segunda bebida mais consumida mundialmente (após a água)⁸¹. Devido à sua ampla distribuição mundial e vasto consumo, a comunidade científica demonstrou nos últimos anos largo interesse na sua aplicabilidade medicinal e nos benefícios que este pode trazer ao ser humano⁸².

O seu consumo é bastante disseminado na cultura asiática e associa-se a ações protetoras no organismo humano, como anti-inflamatória e anti-oxidante¹⁹.

Existem, inclusive estudos que associam a sua ingestão a menor incidência de cancros esofágicos, gástricos, prostáticos e mamários⁸².

O seu principal composto com efeitos na promoção da saúde humana são as catequinas que podem chegar aos 40% da totalidade num copo de chá verde⁸¹. A epigallocatequina-3-galato (EGCG) é o composto polifenol mais ativo e a principal catequina presente no chá verde (cerca de 50-80% de todas as catequinas)^{81,83}.

A EGCG está associada a diversos efeitos benéficos no organismo humano (figura 2.5 - A) nomeadamente⁸³ - antimicrobiano (atua nos microrganismos patogénicos multirresistentes

através da disrupção da sua membrana celular, da inibição da síntese de componentes celulares essenciais ou interrompendo a sinalização celular); antioxidante (previne dano oxidativo celular que aumenta a progressão das doenças neurodegenerativas e cancro, uma vez que o seu anel aromático livre reage com o oxigénio reativo, impedindo-o de oxidar as células⁸⁴); prevenção de doenças cardiovasculares como enfartes e hipertensão (diminui a agregação plaquetária e níveis de colesterol); previne o desenvolvimento de diabetes (regula o *clearance* lipídico nos rins) e de obesidade (promove a oxidação da gordura); anti-inflamatório (reduz a libertação de citoquinas inflamatórias) e por fim, é antialérgico (inibe a expressão de imunoglobulina E que despoleta a resposta alérgica). É ainda reportado que possui capacidade *in vitro* de inibir a desidratação das células falciformes⁸⁵.

A sua atuação de maior importância e impacto clínico é a capacidade anticancerígena pois inibe a angiogénese, metástase e crescimento tumoral ao suprimir vias de sinalização celulares como a PI3K/AKT e MAPK e ainda induz a morte tumoral, ativando a apoptose celular^{19,84,86}.

Adicionalmente, é um reconhecido modulador epigenético, revertendo parcialmente a hipermetilação e reativando a expressão de genes supressores de tumor como o *RECK* em células de carcinoma oral⁸⁷ e dos genes *p16*, *RARB* (*Retinoic Acid Receptor Beta*), *hMLH1* (*human mutL homolog 1*) e *MGMT* (*O⁶-methylguanine DNA methyltransferase*) em células esofágicas cancerígenas⁸⁸.

Este atua também diminuindo a atividade enzimática das DNMT *in vitro* em cancro cervical²⁰, esofágico⁸⁹, da mama⁹⁰ e epidermóide da pele²¹. É ainda reportado que a EGCG diminui a expressão celular das *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em carcinoma epidermóide da pele²¹ e células T linfocitárias⁹¹, da *DNMT3B* em cancro cervical²⁰ e da *DNMT1* em cancro prostático⁹². Está ainda descrito que a EGCG inibe a atividade enzimática da HDAC1 em cancro cervical²⁰, bem como das HDAC1, HDAC2 e HDAC3 em cancro prostático⁹² e do cólon⁹³.

Um estudo recente comprova que o consumo *in vivo* de EGCG numa dose de 225mg e durante 90 dias ocorre um aumento da percentagem de HbF existente na generalidade dos participantes²².

2.5.2. Genisteína (GN)

Já a genisteína (GN), de nome químico 4,5,7-trihidroxiisoflavona, é um composto natural pertencente à família das isoflavonas¹⁵. Está presente na dieta humana diária, existindo em grandes quantidades em produtos derivados da soja e em legumes¹⁵.

O seu consumo é amplamente disseminado em países asiáticos (como a China e Japão) e encontram-se estabelecidas relações entre o seu consumo e a diminuição do risco de cancro prostático em homens japoneses e cancro mamário em mulheres chinesas^{94,95}.

A GN possui efeitos benéficos no ser humano como a proteção dos sistemas cardiovascular, neuronal, renal e hepático, efeito anti-inflamatório e anti-diabético, é anti-oxidante e reduz as reações alérgicas (figura 2.5 – B)⁸³.

É um fito-estrogénio pois possui estrutura bi-fenólica semelhante ao estradiol (figura 2.5 – B) e apesar de em menor escala, pode atuar como antagonista (compete com o recetor do estradiol logo inibe o seu efeito) ou agonista (liga-se aos recetores e ativa a atividade celular) dos recetores de estrogénio. Possui diferentes afinidades conforme o recetor de estrogénio, possuindo 20 a 30 vezes maior força de ligação para o recetor β que para o α ^{96,97}.

Quando se liga aos recetores de estrogénio, provoca uma ação biológica menos extensa, mas ainda suficiente para que seja estudado como possível terapêutica em cancros hormonais¹⁵.

Apesar da atividade competitiva da GN para com os recetores de estrogénio, o seu efeito benéfico em situações cancerígenas pode ser atribuído a mecanismos bioquímicos como a apoptose, modificação do crescimento celular e modificação de vias de sinalização celulares⁹⁷.

Este é considerado um composto anti-carcinogénico pois atua como indutor da apoptose, inibidor da angiogénese e da metastização através da inibição de diversas proteínas quinases (pertencentes à família MAPK que regulam o crescimento, tais como a ERK 1 e 2 e PI3K/Akt)¹⁶. Este inibe o crescimento celular interrompendo o ciclo celular no *checkpoint* da fase G2/M, uma vez que irá ativar a via p38 MAPK e inativar as proteínas ERK1/ERK2, diminuindo a proliferação e estimulando a apoptose⁹⁶.

A nível epigenético, foi associado à diminuição da metilação das regiões promotoras de genes supressores de tumor previamente hipermetilados (logo silenciados) em cancro da mama¹⁸, prostático⁹⁸ e de neuroblastoma (*in vivo*)⁹⁹.

Estudos *in vivo* reforçam a teoria de que a GN pode afetar a metilação tumoral, uma vez que após 3 a 6 semanas de suplementação diária com GN em doentes com cancro prostático os tecidos tumorais possuíam menor nível de metilação em doentes suplementados relativamente ao grupo que recebeu placebo¹⁰⁰.

Esta promoveu a desmetilação dos promotores de genes supressores de tumor em células HeLa (cancro cervical), atribuindo-se este efeito à diminuição da atividade enzimática das DNMT e HDAC¹⁰¹. É reportado que a GN atua diminuindo a expressão génica da *DNMT1* em cancro da mama^{17,18,102} e em células de carcinoma hepatocelular¹⁷.

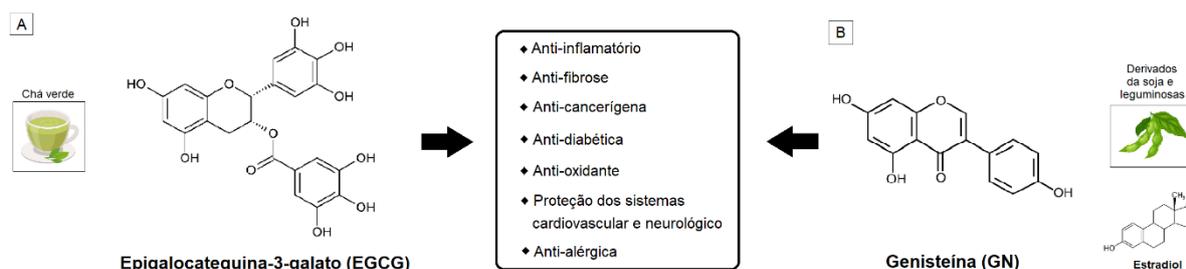


Figura 2.5 - (A) Estrutura química da epigallocatequina-3-galato (EGCG) e da (B) genisteína (GN) e semelhança estrutural ao estradiol, bem como os efeitos benéficos comuns. Adaptado de: Das, Shrayanee & Tanwar, Jyoti & Hameed, Saif & Fatima, Zeeshan. (2014). Antimicrobial potential of epigallocatechin-3-gallate (EGCG): A green tea polyphenol. 2. 167-174 ; Garg, Sheenam & Lule, Vaibhao & Malik, Ravinder & Tomar, Sudhir. (2016). Soy Bioactive Components in Functional Perspective: A Review. International Journal of Food Properties. 19. doi: 10.1080/10942912.2015.1136936.

Devido aos semelhantes efeitos a nível protetor da saúde humana, da atuação epigenética destes dois compostos naturais e à necessidade de desenvolver novas terapêuticas indutoras da HbF nas hemoglobinopatias pelas mencionadas limitações da HU (única profilaxia aprovada para o tratamento de DF, mas não para a β -talassémia, dificuldade da sua aplicação em países com poucos recursos, não ser completamente conhecido o seu mecanismo de atuação), um estudo recente avaliou os efeitos individuais destas na reativação transcricional da γ -globina em células K562²². Neste estudo, demonstrou-se que atuam sem efeitos citotóxicos, com resposta não monotónica e diminuindo os níveis de mRNA (logo da transcrição) do gene repressor *BCL11A*²². Curiosamente, numa exposição de 72 horas, a EGCG a 100ng/mL reprime o *BCL11A* de forma semelhante à HU a 25 μ g/mL²². É ainda extrapolado que atuem em vias de sinalização divergentes porque afetam genes diferentes - a EGCG afetando os genes *HBB* e *HBG1*, enquanto a GN afeta os genes *HBA*, *HBG2* e os reguladores de HbF *MYB*, *KLF1* e *BGLT3*²².

Assim, tanto a EGCG como a GN apresentam, de forma individual, potencial como indutores naturais da HbF²². No entanto, este estudo não avaliou o eventual impacto epigenético que estes compostos podem ter nessa situação e que, eventualmente, justifiquem o verificado impacto transcricional nos genes das globinas e nos reguladores de HbF.

Ao verificar a possível modulação epigenética destes compostos, pode ainda determinar-se se estes atuam mais extensamente como indutores epigenéticos da HbF que a HU e representar uma futura alternativa profilática em doentes com β -hemoglobinopatias.

3. Capítulo 3 - Materiais e métodos

3.1. Classificação do estudo

É possível classificar este estudo quanto ao nível de investigação, à intervenção, ao tempo e ao nível de observação. Relativamente ao nível de investigação, é considerado nível IV já que visa estudar a verificação da relação de causalidade, neste caso o efeito produzido pela exposição do EGCG ou GN num ambiente laboratorial controlado (cultura de células)¹⁰³. Quanto à intervenção, o estudo é intervencional pois existe manipulação por parte do investigador, nomeadamente na escolha do composto (EGCG ou GN), concentração e duração da exposição celular¹⁰³. Mais ainda, este estudo é controlado pois são realizados grupos controlo (uso de HU como controlo positivo ou CP e controlos negativos ou CN sem exposição das células à GN e EGCG)¹⁰³. No entanto, não existe aleatorização pelo que se torna um estudo quase-experimental¹⁰³. No que concerne ao tempo, classifica-se como longitudinal e prospetivo e o nível de observação é agregado¹⁰³.

3.2. Variáveis em estudo

No presente estudo, definem-se as variáveis independentes como “composto usado na exposição celular”, “concentração do composto para exposição celular” e “tempo de exposição celular ao composto”, tendo em conta que estes podem variar entre o uso de EGCG ou GN, em concentrações de 100, 250 ou 500 ng/mL e durante 72 ou 96 horas, respetivamente. Já a variável dependente vai ser o “nível de expressão génica celular” (dos genes moduladores epigenéticos). As diferentes variáveis acima referidas encontram-se caracterizadas no apêndice I.

São consideradas variáveis estranhas neste projeto: as condições laboratoriais de cultura das células K562 na fase pré-tratamento (como temperatura e atmosfera de incubação) – estas foram previamente estipuladas e mantidas constantes, garantindo-se características celulares semelhantes até à etapa de tratamento com os compostos e para que os resultados sejam uma consequência direta destes, sendo ainda realizados triplicados para cada composto e concentração; e a variabilidade intra-operador.

3.3. Instrumento de recolha de dados

Para se obterem os dados experimentais, foi usado um instrumento de recolha de dados – o sistema de Deteção de PCR em tempo real CFX Connect™ da Bio-rad (engloba o programa informático CFX Maestro Software da Bio-rad e o termociclador Bio-Rad iCycler®) onde se realizou a reação de PCR quantitativo em pequena escala (ou qRT-PCR) para obter o nível de expressão génica de moduladores epigenéticos nas células K562.

3.4. Linhagem celular K562

Neste estudo foi usada como amostra a linhagem celular K562, sendo as células resultantes da sua cultura os objetos de estudo.

A linhagem K562 trata-se de células imortalizadas e adaptadas à cultura *in vitro*, provenientes do fluido pleural de uma doente de 53 anos com leucemia mieloide crónica (LMC) em crise blástica¹⁰⁴. Estas são extensamente caracterizadas a nível laboratorial, facilmente cultivadas e dividem-se de forma ilimitada e uniforme como células únicas indiferenciadas¹⁰⁴. Cada célula desenvolve-se individualmente e não são aderentes aquando cultura, crescendo na forma de suspensão (figura 3.1 - A)¹⁰⁵. Apresentam forma arredondada, diâmetro de cerca 20µm, citoplasma basofílico sem grânulos e presença de dois ou mais nucléolos proeminentes (figura 3.1 - B)¹⁰⁵.

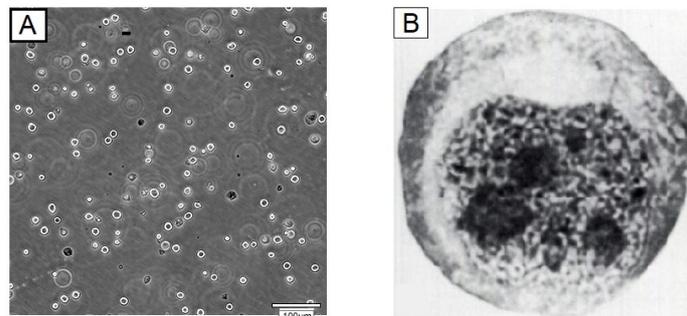


Figura 3.1 - (A) Células K562 em suspensão com baixa densidade. Fonte: ATCC, 2016. **(B) Morfologia da célula K562 na coloração de Giemsa (evidência do citoplasma basófilo, sem grânulos e dos nucléolos proeminentes).** Fonte: Koeffler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. Blood. 1980;56(3):344-350. doi:10.1182/blood.V56.3.344.344.

Uma vez que esta linhagem apresenta semelhanças na eletroforese de glicoproteínas aos eritrócitos (nomeadamente na presença membranar de glicoforina, a principal proteína eritrocitária membranar) considera-se uma linhagem celular eritroleucémica¹⁰⁶.

Por serem células provenientes de uma doente leucémica, a sua cultura resulta em células malignas hematopoiéticas que se diferenciam espontaneamente em progenitores das séries eritrocitárias, granulocíticas e monocíticas¹⁰⁴.

A linhagem celular K562 tem aplicabilidade disseminada para estudo dos mecanismos da diferenciação eritrocitária e expressão dos genes das globinas, uma vez que se tratam de células diretamente obtidas de um ser humano e não existe necessidade de recriar as suas características *in vitro*¹⁰⁵. Mais ainda, o seu uso é recorrente em ensaios teste para possíveis indutores da HbF pois quando expostas a estes agentes, verifica-se um potencial aumento da produção das cadeias de globina ζ , ϵ e γ (Hb embrionária e HbF), mas não das cadeias α e β , sendo portanto bastante específica para alterações nas globinas constituintes da HbF¹⁰⁴.

É ainda uma linhagem facilmente adquirida, pouco dispendiosa, com manutenção laboratorial pouco exaustiva e tempo de subcultura relativamente curto (cerca de 3 dias)¹⁰⁵.

3.5. Procedimentos

As células K562 previamente expostas a concentrações de EGCG e GN de 100, 250 e 500 ng/mL durante 72 ou 96 horas foram primeiramente usadas num estudo já mencionado para avaliar o seu potencial indutor da HbF através do nível de expressão pós-tratamento dos genes das globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*) e reguladores da HbF (*BCL11A*, *KLF1*, *MYB* e *BGLT3*)¹⁰⁷. Nestas células foi ainda avaliada a possível toxicidade destes compostos através dos ensaios de azul de tripano (viabilidade membranar) e CellTiter-Blue® (capacidade metabólica)¹⁰⁷. Estas mesmas células foram colhidas e o seu RNA total foi extraído e criopreservado a -70°C após concretização do mencionado estudo.

O RNA total das células criopreservado foi usado no presente estudo para dar continuidade ao anterior (avaliando o impacto epigenético da EGCG e GN perante o seu potencial indutor da HbF) e permitindo assim, a comparação dos resultados de expressão dos diferentes genes entre ambos os estudos (visto que as células e todas as condições laboratoriais a estas aplicas são as mesmas).

Como tal, os procedimentos de cultura da linhagem celular K562, exposição celular à EGCG e GN, ensaios de viabilidade celular (Azul de Tripano e CellTiter-Blue®) e extração de RNA total a partir das células serão apenas brevemente mencionados porque já foram realizados¹⁰⁷. A ênfase laboratorial recai nos procedimentos realizados no presente estudo - a quantificação do RNA total, conversão a DNA codificante (cDNA) e o qRT-PCR (figura 3.2).

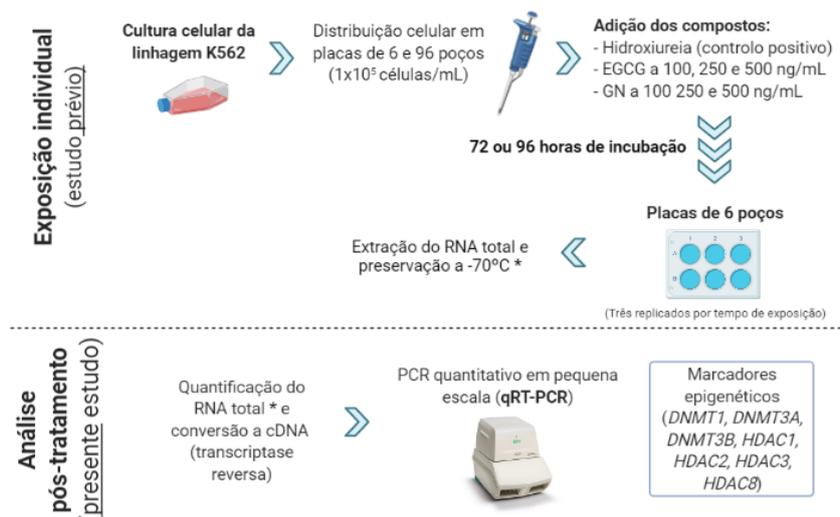


Figura 3.2 – Esquema dos métodos laboratoriais para análise dos efeitos epigenéticos da exposição individual à epigallocatequina-3-galato (EGCG) e genisteína (GN) nas células K562. Fonte própria.

3.5.1. Cultura das células K562, exposição à EGCG ou GN e viabilidade celular

Neste estudo, a linhagem celular K562 foi inicialmente cultivada em frascos de 75cm² com meio RPMI 1640 com GlutaMAX-I, 25mM HEPES e suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal, penicilina, estreptomicina e glutamina.

As células foram estabilizadas a uma densidade de 1×10^5 a 1×10^6 células/mL, realizando-se subculturas a cada 3 dias (entre as quais as culturas foram mantidas numa atmosfera húmida a 37°C com 5% (v/v) de CO₂, conforme indicado pela casa comercial) e visualização microscópica para analisar a sua confluência, número, morfologia e viabilidade.

As células K562 entre as passagens 1 a 14 foram usadas no tratamento com EGCG e GN. A EGCG (CAS number: 989-51-5, Sigma-Aldrich) e a GN (CAS number: 446-72-0, Sigma-Aldrich) encontravam-se armazenadas em solução stock de 5 mg/mL, a partir das quais foram preparadas as soluções de trabalho (para exposição celular). A EGCG foi dissolvida em água, enquanto a GN foi dissolvida noutra solução veículo, o dimetilsulfóxido (DMSO) pois esta apresenta maior solubilidade em solventes polares que em água¹⁰⁸. As soluções stock foram diluídas para formar as soluções de trabalho da EGCG e GN em concentrações de 100, 250 e 500 ng/mL.

Para além dos tratamentos mencionados, foi ainda realizado um controlo positivo (CP) composto por 25µg/mL de hidroxureia (HYDREA®, USP), um conhecido e aprovado indutor de HbF⁸. Foram ainda usados dois controlos negativos (CN) – o CN da EGCG (onde as células K562 irão proliferar no meio de cultura padrão) e o CN da GN (onde o meio de cultura foi suplementado com DMSO, a solução veículo das células expostas à GN).

As células K562 a uma densidade de 1×10^4 células/mL foram cultivadas em placas de 6 poços (3 mL/placa) para avaliação dos efeitos transcricionais e em placas de 96 poços (100 µL/poço) para avaliar os efeitos citotóxicos pós-tratamento.

Foram realizados 3 replicados biológicos para cada composto, concentração e tempo de exposição. As células expostas e os controlos foram incubados numa atmosfera húmida com 5% CO₂, a 37°C, durante 72 ou 96 horas, após as quais foram colhidas para realizar os ensaios de análise pós-tratamento.

Para avaliar os efeitos citotóxicos, foi primeiramente realizado o ensaio de exclusão do azul de tripano. Neste, o uso do hemacitómetro (ou câmara de Neubauer) no microscópio invertido permite determinar o número de células viáveis presentes numa suspensão celular¹⁰⁹. As células vivas possuem uma membrana celular intacta e impermeável a corantes, enquanto que as células mortas têm uma membrana incapaz os excluir. Assim, após adição do azul de tripano à suspensão celular e aquando visualização microscópica, as células viáveis são translúcidas e as não viáveis tem coloração citoplasmática azul.

Em segundo lugar, foi determinada a viabilidade celular com o ensaio CellTiter-Blue® (Promega), seguindo as instruções do fabricante. O reagente CellTiter-Blue® contém um indicador da viabilidade celular azulado (e pouco fluorescente), a resazurina, para medir a capacidade metabólica das células¹¹⁰. As células viáveis possuem metabolismo que reduz a resazurina a resorufina, um composto de tonalidade rosa e com grande fluorescência¹¹⁰. Estas células vão realizar esta conversão continuamente pelo que a fluorescência geral aumenta e muda a tonalidade celular do meio (azul para rosa). Assim, o sinal fluorescente e colorimétrico produzido é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas presentes na amostra.

Após incubação de 4 horas com o mencionado reagente, a viabilidade foi determinada através medição da absorvância num espectrofotômetro de microplacas (Optic Ivymen System 2100C).

3.5.2. Extração e quantificação do RNA total

O RNA total das células K562 previamente tratadas com EGCG e GN, CP e CN, foi extraído por microcentrifugação em coluna de sílica através do sistema SV Total RNA Isolation (Nº Z3101; Promega), de acordo com o procedimento e fundamento especificados no apêndice II. Para permitir continuidade do estudo, após extração, o RNA total foi criopreservado a -70°C, garantindo-se a sua viabilidade ao longo do tempo e permitindo o seu uso no presente estudo.

Assim, após descongelação à temperatura ambiente e estabilização, todas as amostras de RNA total tiveram a sua concentração determinada através de um ensaio baseado na fluorescência, com uso do kit de ensaio Qubit™ RNA HS (Q32852, Thermo Fisher Scientific Inc.), cujo procedimento se encontra descrito no apêndice III.

Neste ensaio, faz-se uso do reagente Qubit® que contém um composto fluorescente que quando livre não imite fluorescência mas, quando se liga a um ácido nucleico (RNA) vai aumentar a sua fluorescência. Esta que pode ser detetada através de um fluorómetro e será diretamente proporcional à concentração de RNA presente na amostra¹¹¹.

A leitura de todos os tubos no fluorómetro Qubit™ 3.0 (Q33216, Invitrogen) foi realizada até 3 horas após incubação, iniciando-se a leitura pelo padrão #1, seguido do padrão #2, servindo estes como calibradores para que o equipamento construa uma curva de calibração que permite, seguidamente, quantificar o RNA presente em cada amostra. Uma vez que o equipamento permite definir inicialmente a quantidade de cada amostra presente no tubo (1µL), bem como as unidades da concentração de amostra final a apresentar (ng/mL), este realiza o cálculo automático da concentração de RNA presente em cada amostra.

A quantificação do RNA presente nas amostras deste estudo encontra-se exposto no apêndice IV.

3.5.3. Conversão do RNA total a cDNA (transcriptase reversa)

De cada amostra retirou-se a quantidade celular correspondente a 2,0µg de RNA total para ser submetido à conversão a cDNA, usando os reagentes Applied Biosystems™ TaqMan™ Reverse Transcriptase (nº4304134, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.), com primers de hexâmeros aleatórios, numa reação de pequena escala (20µL), seguindo as instruções específicas pelo fabricante.

Esta reação recebe também o nome de transcriptase reversa (RT) devido ao nome da enzima através usada para converter o RNA a cDNA¹¹². Cada reação é preparada com – 2,0 µL de tampão 10x para RT; 1,4 µL de MgCl₂ a 25 mM; 4,0 µL de dNTP mix a 10mM (cada dNTP a 2,5mM); 1,0 µL de ditiotretol ou DTT (estabilizador a 100mM); 1,0 µL de inibidor de RNase (20 U/µL); 1,0 µL de RT MultiScribe™ (50 U/µL) e 1,0 µL de primers de hexâmeros aleatórios (50 µM).

Todos estes componentes foram preparados como *master mix* para todas as reações de conversão e posteriormente dispensados para tubos de PCR de 0,5mL. A quantidade de RNA total previamente calculada foi adicionada a cada tubo para perfazer individualmente um volume final de 20 µL.

Para esta reação usou-se o termociclador Bio-Rad iCycler®, com as seguintes condições: 25°C durante 10 minutos (*annealing* ou hibridação dos primers), 37°C durante 30 minutos (síntese de cDNA a partir do RNA total pela RT), 95°C durante 5 minutos (inativação da enzima RT para não interferir com ensaios posteriormente realizados) e paragem a 4°C.

3.5.4. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foi realizado no sistema de Detecção de PCR em tempo real CFX Connect™ (Bio-rad), com uso do kit Supermix iTaq™ Universal SYBR® Green (Bio-Rad) e dos primers específicos listados na tabela 3.1.

O volume final foi de 20µL e seguiram-se as instruções especificadas pelo fabricante para realização desta técnica.

O fundamento desta técnica e procedimento encontram-se especificados no apêndice V.

Tabela 3.1 - Primers específicos para uso na reação de qRT-PCR.

Função	Gene	Número acesso GenBank	Sequência do primer		Tamanho (pb)	Temperatura <i>meltin</i> g (°C)
<i>Housetkeeping</i>	<i>GAPDH</i>	NM_001357943.2	Forward (5'→3')	GAGTCAACGGATTTGGTCGTA	295	54,7
			Reverse (3'→5')	GCAGAGATGATGACCCTTTTG		53,7
	<i>DNMT1</i>	NM_001379.4	Forward (5'→3')	CCTCCAAAAACCCAGCCAAC	101	56,9
			Reverse (3'→5')	TCCAGGACCCTGGGGATTTC		59,0

Moduladores epigenéticos	DNMT3 A	NM_022 552.5	Forward (5'→3')	CCAACATCGAATCCATGAAA	140	50,7
			Reverse (3'→5')	CTTGCGCTTGCTGATGTAGT		55,7
	DNMT3 B	NM_175 850.3	Forward (5'→3')	CGAATTTTACCACCTGCTGAAT T	59	53,9
			Reverse (3'→5')	AGAACGGCCGGTCATCAC		57,8
	HDAC1	NM_004 964.3	Forward (5'→3')	GGAAATCTATCGCCCTCACA	168	54,3
			Reverse (3'→5')	AACAGGCCATCGAATACTGG		54,8
	HDAC2	NM_001 527.4	Forward (5'→3')	CTGTTAATTGGGCTGGAGGA	94	54,6
			Reverse (3'→5')	AATTCAAGGATGGCAAGCAC		53,9
	HDAC3	NM_001 355040.2	Forward (5'→3')	GGACCAGATCCTCCAGACAA	116	56,1
			Reverse (3'→5')	CAGCCTCATCAGTCCTGTCA		56,5
	HDAC8	NM_001 166418.2	Forward (5'→3')	GGTGACGTGTCTGATGTTGG	165	55,9
			Reverse (3'→5')	AGCTCCCAGCTGTAAGACCA		58,2

Em suma, o PCR foi usado para apurar o nível de expressão génica dos moduladores epigenéticos (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8*), com recurso ao gene de referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) para normalização dos dados.

O mecanismo de modulação epigenético individual da EGCG e GN foi avaliado por alterações na expressão génica das *DNMT* e *HDAC* em todos os tratamentos realizados.

As condições aplicadas em cada ciclo no termociclador Bio-Rad iCycler® são as seguintes: 95°C durante 2 minutos (ativação da polimerase); 95°C durante 30 segundos (desnaturação); 55°C por 30 segundos (*annealing*), 72°C por 1 minuto (alongamento) e por fim, 72°C durante 15 min (alongamento final). Após a realização de 45 ciclos, analisaram-se as curvas de desnaturação para descartar a formação de dímeros de primers e a presença de contaminações.

A análise dos resultados do qRT-PCR foi obtida através dos valores de Ct ou *cycle threshold*. Estes representam o número de ciclos necessário para que o sinal de fluorescência aumente acima do valor da fluorescência de fundo ou *threshold*.

Os dados obtidos (Ct) foram então analisados através da quantificação relativa. A quantificação relativa é um método de análise da técnica de PCR que demonstra a diferença entre a expressão do gene alvo em relação a uma referência (como o gene *housekeeping GAPDH*) que são, idealmente, expressos de forma constante independentemente das condições experimentais (como o tecido, desenvolvimento celular ou tratamento da amostra)¹¹³.

A quantificação relativa foi então realizada pela normalização da média dos limiares da fase exponencial ou Ct dos genes alvo com a média Ct do gene *GAPDH*. Os níveis de transcrito

ou mRNA foram expressos pela percentagem relativa e o cálculo da diferença relativa na expressão génica foi realizado através do método $2^{\Delta\Delta Ct}$:

$$\begin{aligned}\Delta Ct_{\text{amostra}} &= Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{GAPDH}} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{\text{amostras}} - \Delta Ct_{\text{referência}} \\ \text{Quantificação relativa} &= 2^{-\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

O $\Delta Ct_{\text{referência}}$ trata-se do valor Ct do calibrador normalizado também com o gene GAPDH, através da subtração do valor Ct do gene *GAPDH* ao valor Ct do calibrador. No tratamento com a GN a solução veículo (DMSO) foi usada como calibrador e nos restantes tratamentos, o calibrador foi o CN (células não tratadas).

Cada reação foi realizada em triplicado para conseguir garantir, durante a análise dos dados, que exista uma menor variação intra-ensaio e garantir assim, que exista maior poder estatístico na representatividade do valor de Ct obtido para cada amostra¹¹³. Os valores obtidos dos três replicados por amostra permitiram calcular a média e o desvio padrão. Foram ainda realizados controlos do PCR com uso de todas as combinações de primers sem a presença de cadeia molde, sendo que estes apresentaram sempre um valor de zero.

3.6. Tratamento estatístico

Os dados obtidos do nível de expressão génica nas células K562 foram introduzidos e trabalhados com recurso ao software IBM SPSS® versão 25 (Armonk, NY, USA).

As diferenças significativas entre dois tratamentos, o CN da EGCG (células cultivadas no meio de cultura padrão) e o CN da GN (células expostas a DMSO) foram avaliados recorrente ao teste t e em seguida, recorrendo-se ao teste ANOVA (análise de variância). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($\bar{x} \pm DP$), estabelecendo-se um nível de confiança de 95% e que valores $p < 0,05$ sejam considerados estatisticamente significativos.

Todos os gráficos foram criados recorrendo-se ao software Microsoft Excel 2016.

3.7. Considerações ético-legais

Este estudo está incluído num projeto financiado pelo Instituto Politécnico de Lisboa registado como IDI&CA-IPL/2019/HemoFet/ESTeSL, previamente aceite pela Comissão de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL) com a referência CE-ESTeSL-Nº10-2019. Ainda assim, este foi submetido ao Conselho de Ética desta faculdade, obtendo-se aprovação (CE-ESTeSL-Nº. 22-2020) para iniciar as tarefas que foram desenvolvidas no Centro de Investigação de Tecnologia e Saúde de Lisboa (H&TRC), localizado na ESTeSL.

4. Capítulo 4 - Resultados e discussão

4.1. Apresentação de resultados

Os efeitos transcricionais na expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8* foram avaliados após exposição das células K562 à EGCG ou GN durante 72 e 96 horas a concentrações de 100, 250 e 500 ng/mL. A expressão relativa destes genes foi analisada através do qRT-PCR e expressos como *Log₂ fold change* (Log_2FC) \pm desvio padrão, em relação ao CN para a EGCG e à solução veículo (DMSO) para a GN. Todos os níveis de expressão génica com diferença estatística pós-tratamento celular obtidos neste estudo encontram-se resumidos na tabela 7.4, presente no apêndice VI.

4.1.1. A GN demonstra maior impacto nos níveis de transcrição das *DNMT* relativamente à EGCG

Em geral para a EGCG, os tratamentos com menores concentrações (100 e 250 ng/mL) e tempo de exposição celular (72h) causam um discreto aumento na expressão relativa da *DNMT1* (figura 4.1 - A). No entanto, é de notar que não se verifica resposta estatisticamente significativa para o gene *DNMT1* em qualquer exposição celular à EGCG. A única diferença estatística verifica-se entre a HU (Log_2FC (HU, 72h) = $0,087 \pm 0,186$) e a EGCG a 100ng/mL (Log_2FC (EGCG 100ng/mL, 72h) = $0,022 \pm 0,163$) e 500ng/mL (Log_2FC (EGCG 500ng/mL, 72h) = $0,207 \pm 0,189$) após 72 horas de exposição ($p < 0,01$), sendo este primeiro o valor mais elevado de expressão relativa obtido para este gene.

Em relação ao gene *DNMT3A* (figura 4.1 - B), apesar de quase todos os tratamentos causarem uma ligeira indução da sua transcrição (exceção de uma exposição de 96 horas à EGCG a 500 ng/mL), apenas se verifica impacto estatisticamente significativo na sua expressão no menor tempo de exposição celular e a uma concentração de EGCG de 250ng/mL (Log_2FC = $0,277 \pm 0,281$). Mais ainda, obteve-se impacto estatístico para a HU às 72 horas (Log_2FC (HU, 72h) = $0,880 \pm 0,091$, $p = 0,006$) e às 96 horas (Log_2FC (HU, 96h) = $0,330 \pm 0,365$, $p < 0,0001$), sendo o primeiro o tratamento para o qual se obteve maior indução transcricional deste gene.

Tal como é verificado para os genes anteriormente referidos, a expressão génica da *DNMT3B* (figura 4.1 - C) sofre um ligeiro aumento após todos os tratamentos, com exceção do tempo exposição de 96 horas na EGCG a 100 e 250 ng/mL, nos quais se verifica maior repressão na concentração intermédia da EGCG (Log_2FC (EGCG 100 ng/mL, 96h) = $-0,013 \pm 0,108$ e Log_2FC (EGCG 250 ng/mL, 96h) = $-0,056 \pm 0,086$), e para a HU (Log_2FC (HU, 96h) = $-0,044 \pm 0,219$).

No entanto, não se verifica diferença estatisticamente significativo na transcrição deste gene em qualquer tratamento celular realizado (EGCG e HU), em ambos os tempos de exposição.

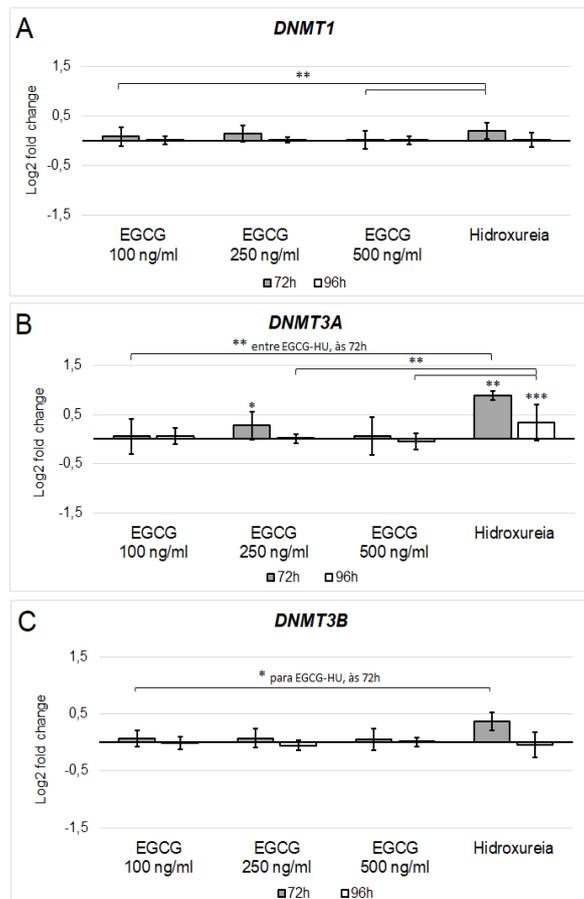


Figura 4.1 - Efeitos da EGCG na expressão dos genes das DNA metiltransferases. Representação gráfica da análise do PCR quantitativo em tempo real da expressão dos genes das *DNMT* após exposição à EGCG e HU. Log₂ fold change (Log₂ (2^{-ΔΔCt}) ± desvio padrão) da expressão génica após 72 e 96 horas de exposição à EGCG a 100 ng/mL, 250 ng/mL e 500 ng/mL são demonstrados para os genes da (A) *DNMT1*, (B) *DNMT3A* e (C) *DNMT3B*. O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas na média do Log₂ fold change através do teste do t estão representadas como *** p<0,001, **p < 0,01 e *p < 0,05.

Quanto à GN, esta aumenta estatisticamente a expressão da *DNMT1* em relação ao CN da GN (meio cultura padrão, com células K562 e suplementado com DMSO) (figura 4.2 – A) em todos os tratamentos realizados (100, 250 e 500ng/mL) e a um tempo exposição de 72 horas. Às 96 horas, apenas afeta estatisticamente o nível transcricional das células expostas a 500ng/mL de GN, inibindo a sua transcrição. As diferenças são mais significativas para as concentrações de GN de 100 e 250 ng/mL nas 72h de exposição (p <0,0001 , para ambas) em relação aos restantes tratamentos que apresentam valores p superiores (p (GN 100ng/mL, 72h) = 0,003 e p (GN 500ng/mL, 96h) = 0,017).

O valor mais elevado de transcrição da *DNMT1* observa-se nas células K562 expostas durante 72 horas a uma menor concentração de GN (Log₂FC (GN 100 ng/mL, 72h) = 0,291 ±

0,061). Este inclusive, apresenta para as condições experimentais realizadas, um valor transcricional superior ao que se obtém para a HU em igual tempo ($\text{Log}_2\text{FC (HU, 72h)} = 0,207 \pm 0,163$). É ainda demonstrado que no tempo de exposição de 96h tende, ao aumentar-se a concentração de GN, a inibir-se proporcionalmente (e não aumentar) a expressão deste gene. O maior valor de repressão é registado para este tempo na GN a 500ng/mL ($\text{Log}_2\text{FC (GN 500 ng/mL, 96h)} = -0,168 \pm 0,100$).

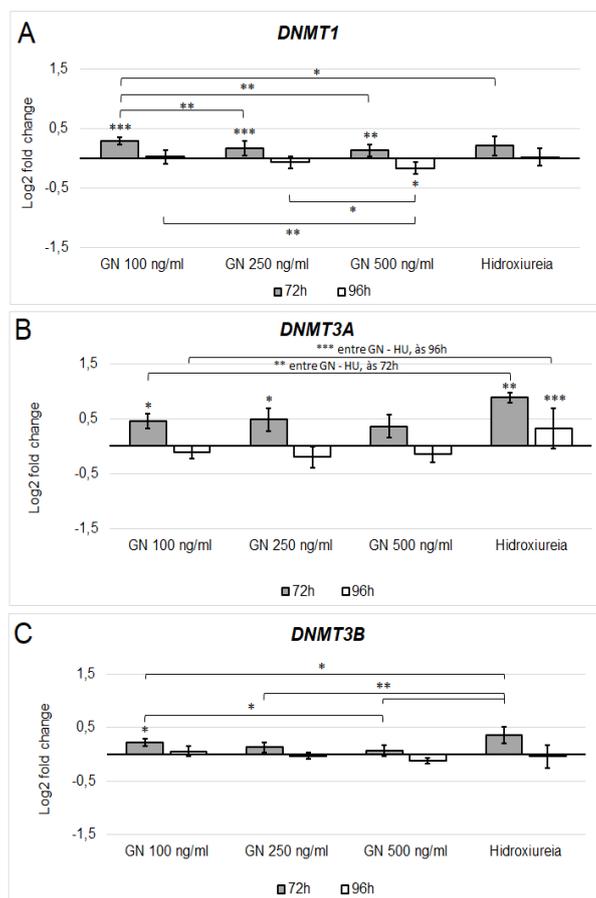


Figura 4.2 - Efeitos da GN na expressão dos genes das DNA metiltransferases. Representação gráfica da análise do PCR quantitativo em tempo real da expressão dos genes das *DNMT* após exposição à GN e HU. Log_2 fold change ($\text{Log}_2 (2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}) \pm$ desvio padrão) da expressão génica após 72 e 96 horas de exposição à GN a 100 ng/mL, 250 ng/mL e 500 ng/mL são demonstrados para os genes da (A) *DNMT1*, (B) *DNMT3A* e (C) *DNMT3B*. O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas na média do Log_2 fold change através do teste do t estão representadas como *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Verificou-se ainda um efeito dose-resposta inversamente proporcional para as 72 horas, entre a GN 100ng/mL e as concentrações de 250ng/mL e 500ng/mL ($p = 0,007$ e $p = 0,006$, respetivamente). Para as 96 horas, verifica-se um efeito dose-resposta diretamente proporcional entre a GN a 500 ng/mL e as concentrações de 250ng/mL ($p = 0,047$) e de 100ng/mL ($p = 0,010$).

Em relação à transcrição do gene *DNMT3A* (figura 4.2 – B) após tratamento celular, verifica-se impacto estatisticamente significativo com a GN a 100 e 250 ng/mL às 72 horas ($p = 0,015$ e $p = 0,041$, respetivamente) e por parte da HU, às 72 horas e 96 horas ($p = 0,006$ e $p < 0,0001$, respetivamente). A maior indução transcricional do gene *DNMT3A* é verificada para uma exposição celular de 72 horas com a HU ($\text{Log}_2\text{FC (HU, 72h)} = 0,880 \pm 0,091$).

De forma semelhante ao verificado para o gene *DNMT1* às 72 horas verifica-se um aumento transcricional do gene *DNMT3A* em relação ao CN da GN, enquanto que às 96 horas se verifica uma repressão génica (com exceção da HU).

Verifica-se ainda diferença estatisticamente significativa entre todos os tratamentos com GN e a HU, tanto nas 72h de tempo exposição ($p < 0,01$) como nas 96h ($p < 0,001$).

Por fim, quanto à transcrição do gene *DNMT3B* (figura 4.2 – C), existem apenas um tratamento que apresenta diferença estatisticamente significativa em relação ao CN da GN a uma exposição de 72 horas, a GN a 100 ng/mL ($\text{Log}_2\text{FC (GN 100 ng/mL, 72h)} = 0,220 \pm 0,073$, $p = 0,044$), ativando a expressão génica. No entanto e apesar de não existir diferença estatística, o maior valor de expressão génica relativa é atribuído a uma exposição celular de 72 horas com a HU a 25 µg/mL ($\text{Log}_2\text{FC (HU, 72h)} = 0,360 \pm 0,156$).

Verificou-se efeito dose-resposta significativo e inversamente proporcional para as 72 horas entre a GN a 100 ng/mL e 500 ng/mL ($p = 0,047$). Existe ainda diferença estatisticamente significativa entre o valor de expressão relativa da HU e todos os tratamentos realizados com a GN para as 72h, sendo este menor entre as concentrações superiores e a HU (p (GN 100ng/mL – HU) = 0,047, p (GN 250 ng/mL – HU) = 0,002 e p (GN 500 ng/mL – HU) = 0,0001).

4.1.2.A EGCG e GN influenciam os níveis de transcrição das *HDAC*

No gene *HDAC1* (figura 4.3 – A), não se verifica resposta estatisticamente significativa para qualquer dose e tempo de exposição celular à EGCG. A HU causa uma redução da expressão relativa do gene *HDAC1* em ambos os tempos de exposição ($\text{Log}_2\text{FC (HU, 72h)} = -0,150 \pm 0,110$ e $\text{Log}_2\text{FC (HU, 96h)} = -0,135 \pm 0,070$), mas apenas com diferenças estatisticamente significativas perante maior duração de exposição celular ($p = 0,021$).

Verifica-se efeito dose-resposta às 72h, uma vez que a diferença estatística entre a expressão génica relativa obtida com a EGCG a 100ng/mL e a de 250 ng/mL tem valor p inferior ao obtido entre a EGCG 100ng/mL e a de 500ng/mL (p (EGCG 100ng/mL, 72h – EGCG 250ng/mL), 72h = 0,045 e p (EGCG 100ng/mL, 72h – EGCG 500ng/mL, 72h) = 0,003). É ainda demonstrada diferença estatística entre a expressão génica relativa obtida às 96h entre a EGCG a 100 ng/mL e EGCG a 250ng/mL ($p = 0,036$) e 500ng/mL ($p = 0,040$).

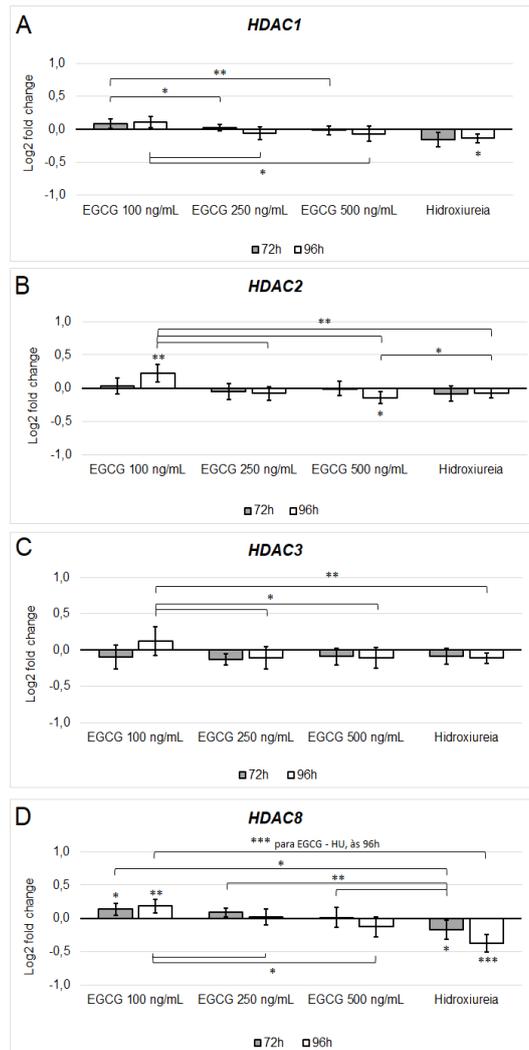


Figura 4.3 - Efeitos da EGCG na expressão dos genes das histonas desacetilases. Representação gráfica da análise do PCR quantitativo em tempo real da expressão dos genes das *HDAC* após exposição à EGCG e HU. Log₂ fold change ($\text{Log}_2(2^{-\Delta\Delta Ct}) \pm$ desvio padrão) da expressão génica após 72 e 96 horas de exposição à EGCG a 100 ng/mL, 250 ng/mL e 500 ng/mL são demonstrados para os genes da (A) *HDAC1*, (B) *HDAC2*, (C) *HDAC3* e (D) *HDAC8*. O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas na média do Log₂ fold change através do teste do t estão representadas como *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Já no gene da *HDAC3* (figura 4.3 – C) verificam-se semelhantes resultados aqueles que foram obtidos para a *HDAC1*, sendo que não se verifica diferença estatística na expressão génica para qualquer tempo de exposição e tratamento realizado com a EGCG ou a HU. De forma geral, tanto a EGCG como a HU tendem a inibir ligeiramente a transcrição deste gene, sendo que apenas a menor concentração de EGCG a um tempo de exposição de 96 horas consegue induzir ligeiramente a expressão da *HDAC3* ($\text{Log}_2\text{FC}(\text{EGCG } 100\text{ng/mL}, 96\text{h}) = 0,127 \pm 0,196$). É demonstrada diferença estatística entre a expressão génica relativa obtida após 96h entre EGCG a 100ng/mL e a HU a 25 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,007$), bem como entre a EGCG a 100 ng/mL e as concentrações de 250ng/mL ($p = 0,016$) e 500 ng/mL ($p = 0,018$).

Em relação á transcrição do gene *HDAC2* (figura 4.3 – B), apenas se verifica diferença estatisticamente significativa no nível de expressão génica das células K562 em relação ao CN da GN (meio cultura padrão e células K562) após 96 horas de exposição para os tratamentos com EGCG a 100 ng/mL ($p = 0,002$) e 500 ng/mL ($p = 0,019$).

Curiosamente, a exposição celular à menor concentração de EGCG durante 96 horas associa-se ao maior valor de expressão génica de todos os tratamentos (Log_2FC (EGCG 100ng/mL, 96h) = $0,221 \pm 0,133$) e produz superior impacto na expressão génica que a HU em igual tempo (que tende a diminuir a expressão génica em relação ao CN, com Log_2FC (HU, 96h) = $-0,070 \pm 0,070$). A EGCG a 500 ng/mL no maior tempo de exposição aparenta causar superior inibição do valor de Log_2FC que a HU em igual tempo de exposição (Log_2FC (EGCG 500ng/mL, 96h) = $-0,145 \pm 0,090$), demonstrando-se diferença estatística entre estes dois tratamentos ($p = 0,042$).

Verifica-se ainda para a EGCG às 96h que a menor e maior concentração causam maior aumento e redução da expressão génica, respetivamente, que a concentração de 250ng/mL (Log_2FC (EGCG 250ng/mL, 96h) = $0,077 \pm 0,100$). É demonstrada diferença estatística entre o Log_2FC obtido nas 96h entre a EGCG a 100 ng/mL e a EGCG 250ng/mL ($p = 0,008$), 500ng/mL ($p = 0,003$) e HU ($p = 0,002$).

Por fim, quanto à *HDAC8* (figura 4.3 – D) apenas se verifica diferença estatisticamente significativa em relação ao CN na menor concentração de EGCG, tanto às 72h ($p = 0,014$) como às 96h ($p = 0,002$). O valor de expressão relativa deste gene é superior numa menor concentração e maior tempo de exposição celular à EGCG (Log_2FC (EGCG 100ng/mL, 96h) = $0,183 \pm 0,105$).

Mais ainda, o controlo positivo (HU) consegue reprimir estatisticamente a expressão do gene *HDAC8* às 72h (Log_2FC (HU, 72h) = $-0,169 \pm 0,140$, $p = 0,04$) e 96h (Log_2FC (HU, 96h) = $-0,372 \pm 0,132$, $p < 0,0001$) com efeito diretamente proporcional ao tempo de exposição.

Verifica-se ainda diferença estatisticamente significativa entre os valores de Log_2FC obtidos entre cada tratamento da EGCG e a HU, conforme o tempo de exposição (p (EGCG 100ng/mL, 72h – HU, 72h) = $0,018$, p (EGCG 250ng/mL, 72h – HU, 72h) = $0,002$, p (EGCG 500ng/mL, 72h – HU, 72h) = $0,008$) e a HU às 96h ($p < 0,0001$).

De forma semelhante aos resultados obtidos para a *HDAC3*, às 96h para a *HDAC8* é demonstrada diferença estatística entre o Log_2FC obtido nas 96h entre a EGCG a 100 ng/mL e a EGCG 250 ng/mL ($p = 0,032$) e 500 ng/mL ($p = 0,025$).

Em relação ao gene *HDAC1* para a GN (figura 4.4 – A), apenas se verifica diferença significativa no nível de transcrição deste gene para um tempo de exposição de 72 horas à GN, nas concentrações de 100 ng/mL ($p = 0,005$) e de 500 ng/mL ($p = 0,040$). Na concentração mais baixa, verifica-se um aumento da expressão génica (Log_2FC (GN

100ng/mL, 72h) = $0,129 \pm 0,110$), contrariamente à maior concentração que aparenta reprimir a expressão deste gene (Log_2FC (GN 500ng/mL, 72h) = $-0,096 \pm 0,080$).

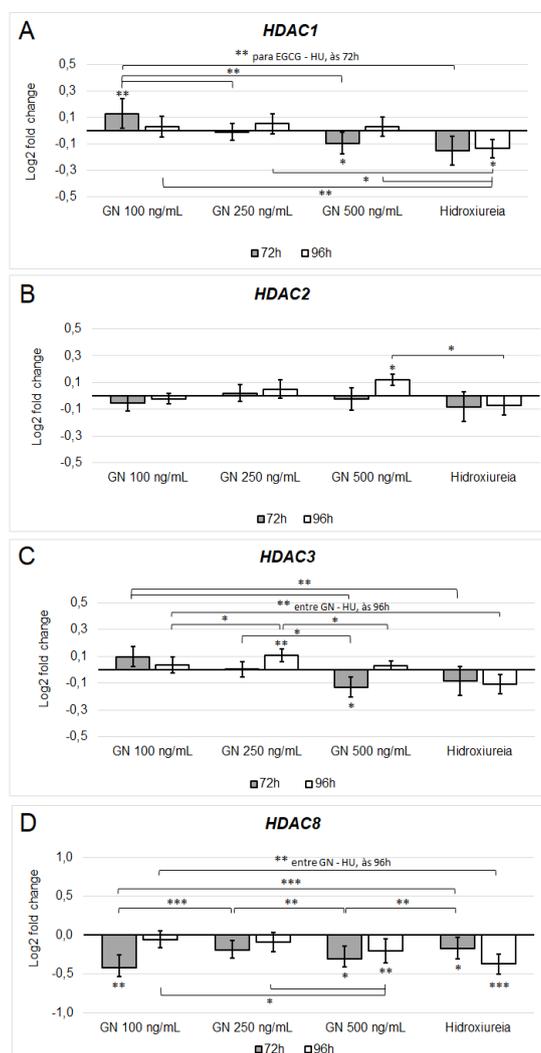


Figura 4.4 - Efeitos da GN na expressão dos genes das histonas desacetilases. Representação gráfica da análise do PCR quantitativo em tempo real da expressão dos genes das *HDAC* após exposição à GN e HU. Log_2 fold change ($\text{Log}_2(2^{-\Delta\Delta Ct}) \pm$ desvio padrão) da expressão génica após 72 e 96 horas de exposição à GN a 100 ng/mL, 250 ng/mL e 500 ng/mL são demonstrados para os genes da (A) *HDAC1*, (B) *HDAC2*, (C) *HDAC3* e (D) *HDAC8*. O *GAPDH* foi utilizado como gene de referência e as diferenças significativas na média do Log_2 fold change através do teste do t estão representadas como *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

Para a exposição das células K562 à HU a 25 μ g/mL, apenas se verifica impacto estatístico às 96 horas (Log_2FC (HU, 96h) = $-0,135 \pm 0,070$), sendo este valor de inibição superior a qualquer outro obtido em igual tempo de exposição para as 3 concentrações de GN (Log_2FC (GN 100ng/mL, 72h) = $0,028 \pm 0,080$, Log_2FC (GN 250ng/mL, 72h) = $0,051 \pm 0,076$, Log_2FC (GN 500ng/mL, 72h) = $0,029 \pm 0,074$). É ainda verificada diferença estatisticamente

significativa entre todos os tratamentos realizados com a GN e a HU a 25 µg/mL, às 72h ($p < 0,01$) e 96h ($p < 0,05$ entre GN 250ng/mL – HU e $p < 0,01$ entre GN 100 e 500 ng/mL – HU). Para a *HDAC2* (figura 4.4 – B), apenas se verifica impacto para a sua transcrição na maior concentração de GN e tempo de exposição ((Log_2FC GN 500ng/mL, 96h) = $0,119 \pm 0,043$), bem como diferença estatística entre este valor e a HU às 96h (Log_2FC (HU, 96h) = $-0,070 \pm 0,070$, $p = 0,026$).

Para o gene *HDAC3* (figura 4.4 – C), existe diferença estatisticamente significativa no nível de expressão em relação ao CN da GN para numa concentração de 500 ng/mL e exposição celular de 72 horas (Log_2FC (GN 500ng/mL, 72h) = $-0,131 \pm 0,074$, $p = 0,021$), sendo este o tratamento que apresenta menor valor de expressão génica relativa. Mais ainda, a maior concentração de GN apresenta ter impacto superior na transcrição deste gene que a HU em igual tempo de exposição (Log_2FC (HU, 72h) = $-0,084 \pm 0,110$).

Para as 96h de exposição, verifica-se ainda um nível de expressão significativo para uma concentração de 250ng/mL de GN (Log_2FC (GN 250ng/mL, 96h) = $0,106 \pm 0,049$, $p = 0,001$). A menor e maior concentração de GN a este tempo de exposição não revelam impacto na expressão génica, demonstrando-se diferença estatística entre o valor de Log_2FC entre a concentração intermédia e as de 100ng/mL ($p = 0,042$) e 500ng/mL ($p = 0,043$). Existe diferença entre todos os valores de expressão relativa da GN às 96h e a HU em igual tempo ($p < 0,01$).

Por fim, no gene *HDAC8* (figura 4.4 – D), a concentração de 100ng/mL de GN durante 72 horas associa-se a uma maior redução transcricional deste gene (Log_2FC (GN 100ng/mL, 72h) = $-0,418 \pm 0,162$), inclusive com impacto estatístico ($p = 0,008$) e valor de Log_2FC superior ao verificado para a HU em igual tempo de exposição (Log_2FC (HU, 72h) = $-0,169 \pm 0,140$, $p = 0,04$).

Verifica-se ainda impacto estatístico para a GN a 500ng/mL às 72h e 96h (Log_2FC (GN 500ng/mL, 72h) = $-0,310 \pm 0,173$ e $p = 0,038$, Log_2FC (GN 500ng/mL, 96h) = $-0,199 \pm 0,095$ e $p = 0,001$). Curiosamente, apenas o valor de expressão génica obtido para a GN a 500 ng/mL durante exposição de 72 horas, mas não o das 96h, é superior ao obtido com HU em igual tempo de exposição (Log_2FC (HU, 96h) = $-0,372 \pm 0,132$). O tratamento celular com a HU conseguiu, às 96h de exposição, causar diferença estatisticamente significativa na repressão transcricional deste gene de forma diretamente proporcional ao tempo de exposição ($p < 0,0001$).

Verifica-se diferença estatística entre os valores de expressão génica relativa obtidos às 72h para a GN a 100 ng/mL e a GN 250 ng/mL ($p < 0,0001$) e HU ($p < 0,0001$), bem como entre as concentrações de 250 e 500 ng/mL ($p = 0,001$) e a maior concentração de GN e a HU ($p = 0,007$).

Para as 96h, existe diferença estatística entre a HU e todos os tratamentos de GN realizados ($p < 0,01$), bem como entre a GN em maior concentração e a GN a 100 ng/mL ($p = 0,018$) e a de 250ng/mL ($p = 0,013$).

4.2. Discussão de resultados

Neste estudo, foi-nos possível responder à questão inicialmente colocada porque a EGCG e a GN aparentam atuar a nível epigenético na potencial indução da HbF. Os objetivos propostos foram atingidos, demonstrando-se que ambos os compostos naturais afetam a expressão génica de moduladores epigenéticos implicados na regulação da HbF em células K562. Mais ainda, estes não afetam apenas a transcrição celular das *DNMT* e *HDAC* após 72h e 96h, mas também de forma concomitante e previamente reportada, a transcrição dos genes das globinas e reguladores da γ -globina.

Os resultados obtidos demonstram que a GN aparenta ter efeitos divergentes às 72h conforme a dose, aumentando os níveis de mRNA da *HDAC1* na concentração mais baixa (100 ng/mL) e inibindo estes níveis na maior concentração (500 ng/mL). Nestas concentrações e tempo de exposição, verifica-se ainda uma diminuição transcrricional das *HDAC8* pós-tratamento. Adicionalmente neste tempo de exposição a GN demonstra capacidade de aumentar os níveis de mRNA da *DNMT3A* exclusivamente nas células expostas a concentrações de 100 ng/mL e 250 ng/mL.

Enquanto a GN no menor tempo de exposição e concentração superior demonstra capacidade de diminuir os níveis de mRNA da *HDAC3*, após 96 horas de exposição, apenas a concentração de 250 ng/mL aumenta o nível de mRNA deste gene.

Já a EGCG causou impacto diminuto na expressão das *DNMT* para ambos os tempos de exposição, estando os seus principais resultados associados à expressão génica das *HDAC*. Em ambos os tempos de exposição, a EGCG aparenta induzir significativamente os níveis de mRNA da *HDAC8* exclusivamente na concentração mais baixa (100ng/mL). Após 96h de exposição, teve impacto significativo nos níveis de mRNA da *HDAC2*, estimulando a sua expressão na concentração mais baixa (100ng/mL) e reprimiu-a na concentração mais elevada (500ng/mL).

Um estudo anteriormente realizado em células K562 demonstra que a EGCG e a GN podem ser potenciais candidatos a indutores da HbF através do nível de transcrição dos genes das globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*) e dos reguladores da HbF (*BCL11A*, *KLF1*, *MYB* e *BGLT3*)¹⁰⁷. Neste estudo, a EGCG e a GN não se demonstram citotóxicos, nem afetam negativamente a proliferação ou metabolismo celular¹⁰⁷. Ambos conseguem inibir significativamente a expressão do gene *BCL11A* (de forma mais extensa que a HU) e afetam os genes das globinas de forma distinta, com a EGCG a afetar a β -globina e a GN a α -globina¹⁰⁷.

Apesar de serem reconhecidos moduladores epigenéticos (afetando a metilação e/ou acetilação celular), o estudo previamente mencionado não chegou a avaliar o impacto epigenético destes compostos quanto ao seu potencial indutor da HbF. Desta forma, o principal objetivo desta tese consiste em avaliar a modulação epigenética (nomeadamente o impacto na transcrição das *DNMT* e *HDAC* após tratamento celular) da EGCG e GN na indução da HbF.

Assim, nesta tese, o RNA total extraído das células K562 expostas durante 72 ou 96 horas à EGCG ou GN a 100ng/mL, 250ng/mL ou 500ng/mL foi usado para conversão a cDNA e seguidamente, realizar qRT-PCR nos genes da *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* e das *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC8* para avaliar os seus níveis de transcrição e possíveis efeitos modulatórios destes compostos pós-exposição individual.

Estudos anteriormente realizados em diversas linhagens celulares cancerígenas demonstram que a EGCG e GN possuem capacidade de diminuir a metilação de genes supressores de tumor, reativando a sua expressão e atuando não apenas como moduladores epigenéticos, mas também como potenciais terapêuticas anticancerígenas^{18,87,88,98,99,101}. Por esta razão e neste estudo, colocou-se a hipótese que estes compostos naturais causam impacto na transcrição de moduladores epigenéticos após exposição das células K562.

Em humanos, os níveis plasmáticos de GN após a ingestão alimentar de soja variam entre cerca de 1 a 5 μM , sendo valores superiores a estes considerados não fisiológicos uma vez que se consideram difíceis de atingir após consumo na dieta normal ou em suplementos⁹⁷. Considera-se ainda que a maior parte da GN pós-metabolização circula complexada com proteínas plasmáticas, sendo que a concentração de metabolito biologicamente ativo que circula “livre” no organismo humano é muito reduzida, atingindo níveis nanomolares⁹⁷.

Apesar dos níveis plasmáticos médios de GN em pessoas que consomem uma dieta ocidental variarem entre os 0,007 e 0,018 μM , estes níveis são superiores em indivíduos vegetarianos (0,04 a 0,09 μM) e em dietas ricas em soja (0,27 a 1,2 μM)⁹⁷.

Um ensaio clínico previamente realizado com a GN em doses de 300 e 600 mg não reporta quaisquer efeitos secundários graves¹¹⁴. O uso de uma única dose de 300mg produz concentrações serológicas máximas de glucorónido (um dos principais metabolitos plasmáticos deste composto) que variam entre os 100 e 500 ng/mL nas 5 horas seguintes à sua administração¹¹⁵.

Tendo em conta a alimentação e os níveis médios plasmáticos de GN atingidos após o seu consumo, neste estudo foram definidas concentrações de GN de 100ng/mL (\pm 0,37 μM), 250ng/mL (\pm 0,93 μM) e 500ng/mL (\pm 1,85 μM).

Quanto à EGCG, foi usada de forma segura em doses de 400 e 800 mg e a sua concentração máxima no plasma (das formas conjugada e livre) encontrou-se sempre abaixo de $1\mu\text{M}$ (nanomolares), 4 horas após administração (variando de 100 a 400 ng/mL)¹¹⁶.

A maior parte da EGCG consumida não entra na corrente sanguínea, dando-se a sua absorção a nível do intestino delgado e grande parte ultrapassando-o até ao intestino grosso, onde sofre degradação extra por parte da microbiota¹¹⁷. A EGCG é o componente polifenol maioritário do chá verde, mas ainda assim não representa a totalidade da sua composição, estimando-se que o consumo diário de 400mL de chá verde equivale a cerca de 243mg de EGCG e 692mg de catequinas¹¹⁸. É pouco provável que indivíduos que consomem diariamente chá verde ou ingerem 2 a 3 cápsulas de extrato de chá verde por dia consigam obter concentrações máximas plasmáticas deste composto que se encontrem nos altos valores de micromolares¹¹⁷. Assim, a biodisponibilidade da EGCG tem de ser considerada quando se extrapolam os resultados *in vivo* e se adaptam para as condições *in vitro*¹¹⁷. A maior parte dos estudos *in vitro* faz uso de doses de EGCG que variam entre os 5 e $100\mu\text{M}$ ¹¹⁹. Torna-se necessário que os estudos adaptem as doses praticadas para serem biologicamente efetivas e mimetizarem as concentrações plasmáticas obtidas *in vivo*, colocando-as nos valores mais reduzidos dos micromolares¹¹⁹.

Tendo por base a bibliografia que sugere valores plasmáticos de EGCG na gama dos nanomolares, no presente estudo as células K562 foram expostas a concentrações de EGCG de 100 ng/mL ($\pm 0,22\mu\text{M}$), 250 ng/mL ($\pm 0,55\mu\text{M}$) e 500 ng/mL ($\pm 1,09\mu\text{M}$).

O destaque das hemoglobinopatias recaí sobre a β -talassémia e drepanocitose, sendo estas atualmente reconhecidas como duas das doenças monogénicas mais frequentes a nível mundial, com associada severidade clínica e maior frequência futura, prevendo-se que a sua prevalência possa aumentar nas próximas décadas^{1,2,61}. Uma das terapêuticas mais promissoras em indivíduos com estas patologias e que permite diminuir as consequências clínicas consiste em induzir a expressão da HbF através de agentes farmacológicos⁶.

Apesar de existirem diversos fármacos testados *in vitro* com este intuito, o seu uso clínico é controverso pela preocupação a nível de toxicidade e/ou potencial carcinogénico em humanos e o seu mecanismo de modulação da HbF nem sempre ser totalmente conhecido¹²⁰. Uma das terapêuticas atualmente mais disseminadas com esta finalidade e das únicas com uso aprovado a nível mundial é a HU, uma droga citostática que retarda o processo de diferenciação eritrocitária e consegue assim, manter um maior número de precursores imaturos no organismo que se associa a maior produção da HbF¹²⁰.

Apesar das vantagens associadas ao uso da HU (como a redução do número de crises decorrentes e necessidade de transfusões), o seu mecanismo de atuação não é conhecido e existem efeitos prejudiciais à saúde dos utilizadores como a mielosupressão e potencial

carcinogénico, existindo ainda doentes que não são ilegíveis a esta terapêutica (como grávidas ou doentes com β -talassémia)¹²⁰. Como tal, continua a existir um grande esforço da comunidade científica em identificar novos indutores farmacológicos da HbF em doentes com hemoglobinopatias que estejam associados a menores consequências para a saúde que HU e sejam facilmente adquiridos em países com poucos recursos¹²⁰.

Com propósito de considerar novas possíveis terapêuticas indutoras da HbF em humanos, um estudo anteriormente realizado demonstrou que produtos naturais da dieta humana como a EGCG, o composto polifenol maioritário do chá verde, e a GN, um componente isoflavonóide presente em produtos da soja, possuem potencial indutor da HbF pois afetam a transcrição de genes da globina (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*) e de reguladores desta Hb (*BCL11A*, *MYB*, *KLF1* e *BGLT3*) em células K562¹⁰⁷. Demonstrou-se ainda que a EGCG e GN em concentrações de 100, 250 e 500 ng/mL, após 72h e 96h de exposição, não despoletam efeitos na proliferação ou viabilidade celular, pelo que não são citotóxicos nestas condições¹⁰⁷. Assim, conclui-se que a EGCG e GN apresentam potencial *in vitro* como indutores farmacológicos da HbF uma vez que não apresentam efeitos citostáticos, nem se associam à inibição ou indução proliferativa excessiva (contrariamente à HU que a inibe)¹⁰⁷.

A regulação transcricional da HbF é realizada ao longo da vida humana através de diversos mecanismos, entre eles os epigenéticos. De forma simplificada, os mecanismos epigenéticos envolvidos no *HbF switch* são a metilação do DNA (realizada por enzimas denominadas DNMT) e a acetilação das histonas (parcialmente realizada por enzimas denominadas HDAC). No presente estudo, os dois compostos naturais estudados produzem resultados divergentes a nível epigenético, estando a EGCG associada efeitos transcricionais diminutos na metilação e mais extensos na acetilação (genes *HDAC2* e *HDAC8*), enquanto a GN causa uma resposta divergente com a dose às 72h, afetando a transcrição de todos os genes das *DNMT* e causando impacto mais extenso na acetilação (todos os genes das *HDAC*) em ambos os tempos de exposição. Como tal, demonstra-se que estes compostos provocam diferença transcricional em moduladores epigenéticos previamente implicados no *HbF switch* (como a *DNMT1*, *DNMT3A*, *HDAC1*, *HDAC2* e *HDAC3*), reforçando assim que estes podem ser potenciais indutores da HbF, atuando possivelmente a nível epigenético.

A DNMT1 foi diretamente implicada no *HbF switch* interagindo diretamente com a proteína repressora BCL11A (como parte do complexo NuRD) e funcionando como supressora da HbF⁴⁸. O *knockdown* da *DNMT1* em células precursoras eritrocitárias adultas permite aumentar significativamente o nível da HbF nestas células, mas a deleção conjunta deste gene e do BCL11A consegue estimular cerca de 2 vezes mais o mRNA da γ -globina⁴⁸.

Já a DNMT3A foi também implicada como repressora dos genes da γ -globina e atua como “ponte” entre a metilação de histonas e do DNA no silenciamento fisiológico e transcricional génico⁴⁹. A enzima PRMT5 (*Protein Arginine Methyltransferase 5*) atua como mediadora na

repressão transcricional do gene da γ -globina durante o *HbF switch*, uma vez que realiza a metilação da arginina 3 na histona 5 que irá recrutar a enzima DNMT3A para este local⁴⁹. Por sua vez, esta irá atuar como repressora da expressão da HbF uma vez que o seu *knockdown* em células K562 leva não apenas a um aumento dos níveis de mRNA dos genes da γ -globina, mas também reduz a metilação nas suas ilhas CpG⁴⁹.

Por último, a DNMT3B não tem, até à presente data, qualquer função específica associada a este mecanismo regulatório.

As HDAC 1 e 2 foram também apontadas como repressoras da expressão da globina fetal, uma vez que o seu *knockdown* em células eritrocitárias adultas permitiu aumentar as expressões relativas desta globina e da embrionária³³. Já a HDAC3 foi também implicada no *HbF switch*, uma vez que o seu *knockdown* por siRNA (após 48 horas) foi suficiente para aumentar significativamente a transcrição do gene da γ -globina⁵¹. Por último, não existe qualquer estudo que associe a HDAC8 à modulação epigenética da HbF.

No presente estudo, a exposição celular à GN após 72h aparenta causar diferença estatisticamente significativa na transcrição do gene *DNMT3A* e *DNMT3B* na concentração mais diminuta (100 ng/mL). Adicionalmente para este tempo de exposição, a GN na menor e maior concentração aplicadas (100 e 500 ng/mL) demonstra-se capaz de modular a expressão da *HDAC1* e *HDAC8*, sem que a concentração intermédia cause diferença estatisticamente significativa na transcrição destes genes.

Os mencionados resultados demonstram uma dose-resposta não monotónica (DRNM) da GN nas células K562 e respostas divergentes conforme a concentração e tempo de exposição celular.

A DRNM é considerada comum em hormonas, bem como em disruptores endócrinos como os fitoestrogénios¹²¹. Tendo em conta que a GN é um fitoestrogénio (estruturalmente semelhante ao estrogénio) pode, em menor escala, atuar nos recetores desta hormona e mimetizar os seus efeitos no organismo humano¹²².

Regra geral, os fitoestrogénios despoletam efeitos estrogénicos em doses baixas e antiestrogénicas em concentrações altas através de diferentes mecanismos moleculares¹²³. No caso da GN, foi anteriormente descrito que atua de forma diferente na adipogénese e osteogénese, sendo que em concentrações baixas (abaixo de 1 μ M) age como um agonista do estrogénio e estimula a osteogénese, mas inibe a adipogénese (através da ativação dos recetores de estrogénio α ou β) e em concentrações elevadas (acima de 1 μ M) vai interagir com recetores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ - *peroxisome proliferator activated receptor gamma*) e inibir a osteogénese, estimulando a adipogénese¹²⁴. Assim, a GN ativa dois alvos moleculares diferentes (recetores estrogénio e PPAR γ) conforme a concentração aplicada, tendo efeitos biológicos (osteogénese e adipogénese) opostos¹²⁴.

A DRNM da GN está ainda concordante com um estudo previamente realizado, no qual suprimiu a expressão do *BCL11A* em células K562 após 72h de exposição em concentrações de 100 e 500 ng/mL, mas num tempo de exposição superior (96h) este efeito apenas foi verificado na concentração de 250ng/mL¹⁰⁷.

A toxicologia clássica, na qual “a dose define o veneno” (princípio de Paracelso), define uma dose-resposta monotónica quando se deteta resposta de um organismo exposto a um tóxico e que esta será diretamente (ou inversamente) proporcional à sua concentração de exposição até atingir a dose máxima efetiva, aquela para além do qual se pode aumentar a dose do tóxico sem que a resposta aumente¹²¹. A DRNM é um conceito que define uma curva representativa da relação dose-resposta de determinado composto que muda de direção (não é linear) dentro do intervalo de doses estudadas¹²¹. A situação não monotónica é cada vez mais frequente na atualidade e representa um desafio aos conceitos fundamentais da toxicologia (a resposta não é linear perante um aumento da dose praticada) e na avaliação do risco da exposição ao tóxico (não se podem seguir os princípios básicos para testar os níveis de biosegurança e exposição ambiental, extrapolando respostas obtidas ao testar a dose mais elevada porque os efeitos a doses mais baixa podem não ser proporcionais)¹²¹.

Não existe apenas um mecanismo aceite pela comunidade científica no qual assenta a etiologia da DRNM, sendo que as teorias propostas são diversas e complexas, como a existência de diversos alvos moleculares pelos quais o tóxico estudado tem diferentes afinidades e efeitos opostos (o composto tem afinidade para o recetor A em doses baixas e induz efeitos biológicos, mas ao aumentar a dose irá também ligar-se ao recetor B que causa efeitos opostos ao que a primeira ligação despoleta) ou a dessensibilização do recetor específico (em altas doses o xenobiótico vai saturar os recetores para os quais tem afinidade e causar a desregulação da sua atividade, com conseqüente diminuição do efeito biológico observado em doses baixas)¹²¹.

Neste estudo, a EGCG após 96h de exposição, teve impacto significativo nos níveis de mRNA da *HDAC2*, apresentando efeitos divergentes conforme a dose pois estimulou a sua expressão na concentração mais baixa e reprimiu-a na concentração mais elevada. Em ambos os tempos de exposição aplicados, a EGCG aparenta induzir significativamente os níveis de mRNA da *HDAC8* exclusivamente na concentração mais baixa.

Os mencionados resultados demonstram também que os efeitos da EGCG nas células K562 seguem uma dose-resposta não monotónica (DRNM) e resposta divergente conforme a dose. A DRNM foi previamente descrita para a EGCG reportando-se que uma concentração de 100ng/mL e tempo de exposição de 72h em células K562 causa uma repressão transcricional do *BCL11A*, enquanto células expostas durante 96h apenas apresentam impacto no nível de mRNA deste gene numa concentração de 250ng/mL¹⁰⁷.

De forma recente, existem autores que reportam a apetência de atuação da EGCG em recetores de estrogénio (ER- α e ER α 36)¹²⁵. Se esta afinidade for futuramente comprovada, pode ser justificação plausível para que a EGCG reproduza efeitos de DRNM.

Adicionalmente, os nossos resultados demonstram que a EGCG apenas afetou os níveis de mRNA da *DNMT3A* na concentração de 250ng/mL (\pm 0,55 μ M) e tempo de exposição de 72h, sem que qualquer outra dose ou tempo de exposição apresente impacto estatisticamente significativo em relação ao CN da EGCG em qualquer gene das *DNMT*. Estudos previamente realizados demonstram que este composto natural tem capacidade de alterar o *status* de metilação celular, diminuindo a expressão da *DNMT3B* em células HeLa (cancro cervical - EGCG a 25 μ M, tratamento de 72 horas)²⁰ e de todos os genes das *DNMT* em células A431 (carcinoma epidermóide - 10 a 20 μ g/mL ou 22 μ M a 44 μ M, tratamento de 72h a 144h)²¹ e em células Jurkat (células T linfocitárias - EGCG a 10 μ M, tratamento de 48 horas)⁹¹. No presente estudo, a EGCG apenas demonstra capacidade de modular a transcrição do gene *DNMT3A* às 72h e de mais nenhum gene das *DNMT* em qualquer tempo de exposição. Os nossos resultados são discordantes com os dois últimos estudos mencionados (é apenas verificada uma redução transcricional significativa do gene *DNMT3A* em relação aos restantes), provavelmente porque no presente estudo a concentração celular aplicada é inferior à praticada pelos outros autores^{21,91}.

Em todos os mencionados estudos, não apenas a linhagem celular estudada é diferente da K562 (diferentes células podem metabolizar o composto de forma distinta ou possuir afinidade díspar para com este), mas também as concentrações de EGCG aplicadas são muito superiores às praticadas neste estudo e podem explicar o impacto significativo obtido nos níveis de mRNA destes genes que não é obtido no presente estudo.

Ainda assim, a capacidade da EGCG de inibir a metilação do DNA é controversa porque nem sempre exerce um efeito na metilação celular. Assim, os nossos resultados demonstram-se concordantes com os obtidos num estudo de 2005, no qual a EGCG (20 ou 30 μ M, 6 dias de tratamento com substituição a cada 48h) não aparentou inibir a metilação do DNA nem reverter a hipermetilação de genes supressores de tumor (como o *p16*) em células T24 (carcinoma das células de transição da bexiga), HT29 (adenocarcinoma colo retal) e PCR3 (adenocarcinoma prostático)¹²⁶. Os nossos resultados são ainda concordantes com um segundo estudo de 2006, no qual a exposição de EGCG (2, 10 ou 50 μ M, 3 dias tratamento) não aparenta alterar o nível de metilação das ilhas CpG em células HCT116 (cancro do cólon), nem o *status* de metilação da região promotora do gene supressor de tumor *TIMP-3* (Metalloproteinase inibitor 3)¹²⁷. Neste último estudo, é colocada a hipótese explicativa do dano oxidativo como consequência da auto-oxidação *in vitro* da EGCG visto que esta

despoleta a formação de micronúcleolos nas células, mas não causa efeito na metilação génica¹²⁷.

Apesar de, aparentemente, a EGCG não afetar extensivamente a maquinaria de metilação, esta teve efeitos na transcrição génica relativa à desacetilação. A sua exposição celular em ambos os tempos aplicados conseguiu induzir significativamente os níveis de mRNA da *HDAC8*, exclusivamente na concentração mais baixa (100ng/mL). No tempo de exposição de 96h existiram efeitos dose divergentes tendo em conta que a dose mais baixa de EGCG (100ng/mL) conseguiu induzir a expressão da *HDAC2*, enquanto a dose mais elevada (500ng/mL) inibiu a expressão deste gene, em níveis maiores que os conseguidos pela HU em igual tempo. De facto, a enzima HDAC2 foi previamente implicada no *HbF switch* como repressora dos genes da γ -globina³³ pelo que a sua inibição pela EGCG demonstra o seu potencial indutor epigenético da HbF.

Os resultados obtidos neste estudo são concordantes com outro de 2015 no qual a EGCG a 25 μ M não consegue inibir a transcrição da *HDAC1* após 48h e 72h de exposição em células HeLa²⁰.

Adicionalmente, um estudo no qual é aplicado GTP (*Green Tea Polyphenol*), um composto que possui como principal componente a EGCG, a células de cancro prostático (LNCaP) numa concentração de 10 μ g/mL (\pm 14 μ M de EGCG) durante 72h causa uma diminuição transcricional dos genes *HDAC1*, *HDAC2* e *HDAC3*⁹². Em relação ao nosso estudo, a única concordância de resultados verifica-se numa diminuição da transcrição génica da *HDAC2* na maior concentração (500ng/mL \pm 1,09 μ M), mas num tempo de exposição celular superior ao do mencionado artigo (96h).

Posteriormente, um artigo de 2013 expõe células de carcinoma do cólon (HCT 116 e HT-29) a doses de 50, 100 e 150 μ M de EGCG durante 72h (tempo igual ao aplicado no presente estudo), analisando de seguida a expressão génica das *HDAC1*, *HDAC2* e *HDAC3*⁹³. Após 72h de exposição celular, a expressão de todas estas *HDAC* nas células HCT 116 foi inibida nas concentrações de 100 e 150 μ M⁹³. Já nas células HT-29, apenas a concentração de 150 μ M demonstra capacidade de reduzir todas as *HDAC* enquanto a de 100 μ M apenas reduziu o nível de mRNA da *HDAC3*⁹³. É de notar que neste e anterior estudo apresentado, é mais frequente a inibição dos níveis de mRNA das *HDAC1*, *HDAC 2* e *HDAC3* após tratamento celular de 72h com a EGCG, sendo estes divergentes em relação ao nosso estudo no qual não se reporta diferença estatística no nível de mRNA de qualquer *HDAC* após tratamento com a EGCG em igual tempo de exposição celular. A diferença mais notória em relação ao presente estudo acabam por ser as condições de estudo praticadas *in vitro*, nomeadamente a linhagem celular utilizada e dose de EGCG aplicada. Desta forma, uma possível justificação para que os nossos resultados não se demonstrem concordantes com os anteriormente obtidos pode passar pelo diferente metabolismo deste composto conforme a

linhagem celular ou que as doses de exposição das respetivas células sejam muito superiores às usadas neste estudo, acabando por causar mudança transcricional pós-tratamento.

Em relação à GN, os nossos resultados demonstram que no menor tempo de exposição, todas as concentrações são capazes de aumentar os níveis de mRNA da *DNMT1* pós-tratamento, sendo que a GN a 100 ng/mL possui ainda capacidade de estimular a expressão da *DNMT3A* e *DNMT3B* e a concentração intermédia apenas aumenta a transcrição da *DNMT3A*. Assim, os nossos resultados evidenciam que a GN aparenta possuir maior afinidade de modulação transcricional da *DNMT1* em relação aos restantes genes das *DNMT* após 72h, sendo este resultado concordante com estudos previamente realizados em linhagens celulares de cancro mamário e hepatocelular^{17,18,102}. Um estudo de 2014 vai um pouco mais longe e reporta uma possível explicação entre a inibição da DNMT1 por parte da GN através de modelos moleculares de interação *in silico*, no qual este composto natural irá impedir a interação entre uma citosina do DNA hemimetilado e uma região ativa na enzima que é necessária para subsequente processo de metilação¹⁸. A GN terá afinidade para este local catalítico, formando ligações hidrogénio com resíduos proteicos e conseguindo assim, bloquear a ação enzimática desta DNMT¹⁸.

É ainda de frisar que os mencionados estudos reportam uma diminuição transcricional da *DNMT1* enquanto que no presente estudo se reportam um aumento dos níveis de mRNA deste gene^{17,18,102}. No entanto e apesar da DNMT1 estar associada à diminuição da expressão dos genes da γ -globina⁴⁸, a regulação positiva deste gene obtida no presente estudo não implica estritamente que a HbF seja suprimida, uma vez que o aumento do mRNA deste gene pode não implicar um aumento da quantidade de enzima com efeitos biológicos na metilação génica ou um aumento da sua atividade enzimática.

Após 96h de exposição, a GN inibiu a expressão da *DNMT1* na dose mais alta (500 ng/mL). Dois estudos previamente realizados em células mamárias cancerígenas demonstram que o impacto na DNMT1 é diretamente proporcional à dose e tempo de exposição à GN, sendo portanto este um resultado apoiado pela literatura^{18,99}. Para além disso, a DNMT1 foi identificada como coadjuvante do BCL11A e MYB, dois supressores da HbF¹²⁸, pelo que a sua diminuição transcricional em níveis superiores aos obtidos para a HU em igual tempo demonstra o seu potencial epigenético como indutora da HbF.

Conforme já mencionado, as DNMT3A e DNMT3B são consideradas metiltransferase *de novo* porque adicionam simetricamente um grupo metil a duas cadeias de DNA previamente desmetiladas, tendo a capacidade de modificar os padrões epigenéticos iniciais dos genes e metilar ilhas CpG que se encontravam intactas⁴⁶. Assim, um aumento da transcrição da *DNMT3A* e *DNMT3B* por parte da GN acaba por ter maior interesse que um estímulo transcricional da *DNMT1* (metiltransferase de manutenção) do ponto de vista terapêutico nas hemoglobinopatias nas quais a expressão dos genes da γ -globina já está a ser suprimida de

forma fisiológica (através da metilação da sua região promotora e da atuação seus repressores transcricionais como o BCL11A) porque estas podem reverter esta situação e modificar o *status* de metilação génico, reativando a expressão da HbF.

Após 72h, um tratamento celular com a GN a 500ng/mL consegue diminuir os níveis de mRNA da *HDAC1* e da *HDAC3* de forma mais extensa que o obtido para a HU em igual tempo. A *HDAC1* foi apontada como repressoras da expressão da globina fetal³³ e a *HDAC3* foi implicada no *HbF switch* uma vez que o seu *knockdown* foi suficiente para aumentar significativamente a expressão dos genes da γ -globina⁵¹, demonstrando-se assim com estes resultados que a GN pode atuar a nível epigenético como potencial indutor da HbF.

É de notar que os estudos em relação à expressão génica das HDAC após o tratamento com a EGCG ou GN são mais limitados pois estas enzimas encontra-se associadas a determinados tipos de cancro, sendo estudadas após literatura inicial que indique quais estão implicadas em determinada patologia. Exemplificando, um artigo de 2020 analisa em HMEC (*Human Microvascular Endothelial Cells*) a expressão das HDAC pós-tratamento com a EGCG previamente implicadas em carcinomas endoteliais, as *HDAC1*, *HDAC3*, *HDAC5* e *HDAC7*, mas não das *HDAC2* e *HDAC8*¹²⁹. Como tal, nem sempre as HDAC de classe I estão associadas de forma universal a situações cancerígenas, variando conforme o tumor e dificultando a comparação dos resultados obtidos anteriormente e os do presente estudo.

Além do mais, no caso do *HbF switch* apenas se encontra estabelecido que as *HDAC1*, *HDAC2* e *HDAC3* estejam implicadas neste processo, sem que o seu mecanismo de atuação seja totalmente conhecido pelo que se torna difícil realizar uma escolha seletiva de moduladores de desacetilação para estudar relativamente ao potencial indutor da HbF após tratamento com a EGCG e a GN.

Ainda que não seja classificada como um agente hipometilador, a HU foi anteriormente associada com uma discreta metilação (ainda que sem atingir impacto estatístico) da região promotora dos genes da γ -globina após o seu uso^{130,131}. Um estudo de 1984 coloca a hipótese de que um dos mecanismos de atuação deste composto seja através da hipometilação do gene da γ -globina, acompanhado de um aumento da sua expressão¹³². Apesar de ser uma das escassas terapêuticas aprovadas pela Agência Europeia do Medicamento para aumentar os níveis de HbF em pacientes adultos com DF, pelo nosso melhor conhecimento, a possível atuação da HU em moduladores epigenéticos ainda não foi estudada até à atualidade. Consequentemente, este é um estudo pioneiro para avaliar se este medicamento pode regular a HbF através da modulação transcricional das *DNMT* e/ou *HDAC*.

De acordo com os nossos resultados, a HU conseguiu estimular a expressão da *DNMT3A* em ambos os tempos de exposição, de forma mais extensa às 72h que às 96h. Adicionalmente, este composto causa uma diminuição dos níveis de mRNA da *HDAC8* em ambos os tempos

de exposição e consegue ainda inibir os níveis da *HDAC1* às 96h. A HU aparenta ter um efeito mais extenso na metilação às 72h e na desacetilação às 96h, sugerindo que diferentes vias moleculares possam estar envolvidas no seu mecanismo modulatório epigenético.

A HU demonstra afetar mais extensamente a transcrição da *DNMT3A* (metilase *de novo*), um resultado que pode ser importante visto que, conforme mencionado anteriormente, a manutenção dos genes *HbG* em pacientes com hemoglobinopatias precisa de ser efetuado após o nascimento e os moduladores epigenéticos precisam de atuar quando os padrões epigenéticos já se encontra pré-estabelecidos e a expressão da HbF tem de ser reativada.

Comparando os resultados dos moduladores epigenéticos obtidos com a HU relativamente aos outros dois compostos naturais aplicados, é notório que existe maior semelhança na modulação transcricional efetuada entre a HU e a GN. Às 72h e na dose de 100 ng/mL, a GN efetua uma inibição transcricional da *HDAC8* em níveis superiores à HU e ainda um estímulo dos níveis de mRNA da *DNMT3A*. Ainda nesta concentração e tempo de exposição com a GN, esta aparenta efetuar a modulação dos mesmos genes que a HU após 96h de exposição (*DNMT3A*, *HDAC1* e *HDAC8*) e adicionalmente, dos genes *DNMT1* e *DNMT3B*. Mais ainda, no menor tempo de exposição, a dose mais elevada da GN provoca nas células K562 uma maior inibição transcricional da *HDAC3* que a HU para este tempo e gene, sendo que esta última não chega a obter impacto estatisticamente significativo.

Em relação à EGCG e apesar de neste estudo se obterem resultados mais discrepantes entre a sua modulação epigenética em comparação à HU, esta consegue, na maior dose e tempo de exposição, inibir mais extensamente o gene *HDAC2* que a HU em iguais condições.

O conjunto destes resultados vai assim demonstrar que tanto a EGCG como GN possuem potencial como indutores epigenéticos da HbF.

Os resultados obtidos neste estudo para a modulação epigenética da GN não se assemelham apenas à HU, mas também à modulação epigenética demonstrada noutros estudos com agentes hipometiladores previamente considerados para indução epigenética da HbF (através de inibição das DNMT).

O primeiro agente hipometilador que demonstrou aumentar a expressão de γ -globina foi a 5-azacitidina, um inibidor da metilação do DNA que aumentou a expressão de HbF e reduziu as anormalidades celulares em ensaios clínicos de pequena escala⁷¹. Apesar da sua aplicabilidade, não se chegaram a realizar ensaios em larga escala devido ao seu potencial mutagénico⁷⁰. Posteriormente, a decitabina, um metabolito da 5-azacitidina que não se incorpora no RNA e associado a menor citotoxicidade, demonstrou maior eficácia em aumentar a expressão de HbF em adultos com hemoglobinopatias⁷¹.

Um estudo previamente realizado em linhagens celulares de leucemia mielóide aguda demonstra que tanto a 5-azacitidina como a decitabina podem despoletar a hipometilação do

DNA e ainda depleção da enzima DNMT1¹³³. De forma análoga, no presente estudo, a GN aparenta afetar mais extensamente a transcrição da *DNMT1* em relação à *DNMT3A* e *DNMT3B* no menor tempo de exposição celular (72h) pois todas as doses aplicadas demonstram impacto no nível de mRNA deste gene.

No anterior estudo, a 5-azacitidina associa-se a maior redução na viabilidade celular (diretamente proporcional ao tempo de exposição aplicado que variou entre 24h, 48h ou 72h) que a decitabina, apesar de ser reportado que ambos causam impacto neste parâmetro¹³³. Curiosamente e contrariamente ao mencionado estudo para os agentes hipometiladores, a GN não aparenta causar impacto na viabilidade das células K562 após 72h e inclusive, após exposições mais prolongadas de 96h¹⁰⁷. A GN poderá ser um viável modulador epigenético da HbF pois além de causar semelhante impacto epigenético que os agentes hipometiladores previamente considerados, pode ainda ser mais vantajosa por associação a menor citotoxicidade.

Em relação à acetilação, um derivado do ácido butírico (reconhecido inibidor das HDAC) denominado butirato de arginina foi escolhido para aplicação em ensaios clínicos de pequena escala, demonstrando-se eficaz no aumento da HbF⁷². No entanto, a terapia não manteve consistência no seu desempenho em ensaios de maior dimensão e a sua dificuldade de administração não permitiu que se desenvolvesse o seu uso clínico^{5,63,70}.

Um estudo de 2018 realizado em células epiteliais mamárias bovinas demonstra que o sódio de butirato (derivado do ácido butírico) possui capacidade de inibir a atividade de algumas HDAC de classe I, nomeadamente das HDAC2, HDAC3 e HDAC8¹³⁴. No presente estudo e após 72h de exposição celular, a EGCG e GN aparentam afetar o nível de mRNA do gene *HDAC8* sendo que a GN consegue para além disto, afetar a transcrição do gene *HDAC3*. No maior tempo de exposição celular, tanto a EGCG como a GN conseguem afetar o nível de expressão do gene *HDAC3*, sendo que a GN consegue afetar exclusivamente a *HDAC2*. Os nossos resultados acabam assim por ser semelhantes com o estudo previamente reportado, tendo a EGCG e GN capacidade de afetar iguais genes conforme a dose e tempo de exposição.

Pelo nosso estudo e em relação aos mencionados, a EGCG e a GN poderão ser viáveis moduladores epigenéticos da HbF pois podem causar semelhante impacto epigenético que agentes inibidores das HDAC previamente considerados como indutores desta Hb em doentes com hemoglobinopatias. No entanto, é de ter em atenção que apesar da semelhança, os nossos resultados não são diretamente comparáveis com os mencionados estudos de agentes hipometiladores e inibidores das HDAC porque difere o objetivo de estudo, sendo neste avaliado o impacto dos compostos na transcrição das *DNMT* e *HDAC* e nos outros avalia-se o impacto dos compostos na depleção das enzimas que originam.

Tendo em conta os resultados obtidos neste estudo para os moduladores epigenéticos após exposição das células K562 com a EGCG e GN, torna-se importante correlacioná-los com um estudo previamente realizado (nestas mesmas células e condições laboratoriais) sobre os efeitos destes compostos nos genes das globinas (*HBA*, *HBB*, *HBG1* e *HBG2*) e reguladores da HbF (*BCL11A*, *KLF1*, *MYB* e *BGLT3*)¹⁰⁷, de forma a complementar o trabalho realizado e tentar estabelecer relações entre os níveis de expressão génica pós-tratamento dos diferentes genes implicados na regulação transcricional da HbF.

Entre este estudo e o anteriormente realizado, existem resultados concordantes como, numa exposição celular de 72 horas à GN a 500 ng/mL, existir diminuição dos níveis de mRNA do gene *HDAC3* (em níveis superiores aos da HU em igual tempo) e ainda uma diminuição transcricional do *BCL11A*. Não apenas a *HDAC3* foi implicada como repressora dos genes da γ -globina⁵¹, mas o *BCL11A* é também um reconhecido repressor da HbF, pelo que estes resultados demonstram que a GN é um promissor candidato a indutor da expressão desta globina. Mais ainda, após este tratamento, obtém-se um aumento dos níveis de mRNA da *DNMT1*, repressora da HbF⁴⁸. Assim, é expectável que se não se verifique diferença no nível transcricional de qualquer um dos genes *HBG* após este tratamento celular pois existe um equilíbrio entre a sua inibição (aumento da *DNMT1*) e ativação transcricional (diminuição do *BCL11A*). De forma análoga, após um tempo de exposição de 96h com a GN a 250ng/mL, não se verifica impacto significativo no nível de mRNA dos genes *HBG1* e *HBG2* uma vez que é inibida a transcrição do *BCL11A* e estimulada a da *HDAC3*.

Numa exposição celular mais prolongada à GN na maior concentração, é expectável não existir impacto transcricional nos genes *HBG1*, *HBG2* nem *BCL11A* porque apesar do *KLF1* atuar como ativador do *BCL11A* (*upstream*)³⁷ e este diminuir o seu nível de mRNA pós-tratamento, verifica-se um aumento do nível da *HDAC2* que colabora com o *BCL11A* como repressora da HbF³³. Ainda a este tempo de exposição, a HU às 96h aparenta diminuir a transcrição da *HDAC1* que atua no complexo NuRD como coadjuvante do *BCL11A* e justificando assim, a diminuição dos níveis de mRNA deste regulador da HbF pós-tratamento³³.

Curiosamente, após 72h de exposição, a menor concentração de EGCG aumentou os níveis de transcrição da *HDAC8* e também diminui os níveis do *BCL11A* em níveis superiores aos causados pela HU em igual tempo. Mais ainda, a exposição durante 72h à GN na menor e maior dose (100 e 500 ng/mL) estão associadas com uma diminuição dos níveis de mRNA da *HDAC8* e diminuição concomitante nos níveis do *BCL11A*. Para a HU, em ambos os tempos de exposição, esta causa uma inibição transcricional da *HDAC8* e concomitante diminuição do *BCL11A* às 96h. A enzima *HDAC8* não possui um papel estabelecido na regulação da HbF, mas os nossos resultados sugerem que pode estar envolvida neste processo uma vez que parece estar associadas a efeitos nos reguladores da HbF em todos os tratamentos

efetuados (EGCG, GN e HU). Poderá considerar-se a realização de estudos futuros para determinar a sua função na regulação da HbF.

Provou-se que um inibidor da via ERK, o composto U0126, tem capacidade de induzir a expressão da HbF em cultura de células progenitoras eritrocitárias humanas¹³⁵. Recentemente, a HDAC8 foi ligada à reativação da via de sinalização ERK para promover a apoptose em macrófagos¹³⁶. Se a via ERK estiver ligada à indução da HbF e a HDAC8 possa ter um papel na sua reativação, esta pode ser uma explicação para a possível função desta enzima na regulação da HbF. Mais ainda, a EGCG e a GN foram previamente caracterizadas como indutoras da via ERK^{101,137}, o que pode explicar os resultados obtidos para os níveis de mRNA da *HDAC8* pós-tratamento com estes compostos.

No entanto, existem alguns genes que após o menor tempo de exposição celular (72h) à GN se associam a resultados entre este estudo e o anteriormente realizado¹⁰⁷ que não são passíveis de ser relacionados tendo apenas por base o seu nível de expressão obtido, não se conseguindo colocar uma hipótese explicativa plausível com base na literatura atualmente existente sobre este tema. Após 72h, uma concentração mais diminuta deste composto (100ng/mL) aparenta diminuir a transcrição do *BCL11A* e a nível epigenético, estimular a transcrição dos genes *DNMT1* e *HDAC1*. Tanto a enzima DNMT1 como a HDAC1 fazem parte do complexo NuRD que interage diretamente com a proteína BCL11A, pelo que seria expectável um aumento concomitante dos níveis de mRNA destes 3 genes^{33,48}.

Verifica-se ainda que após 72h, a GN a uma concentração de 250ng/mL aparenta diminuir os níveis de mRNA da *HBA* e contrariamente, aumentar os níveis da *DNMT1* e *DNMT3A*. A DNMT1 e DNMT3A foram apontadas como repressora da expressão da HbF^{48,49}, mas até à presente data, nenhum estudo associa estas enzimas à modulação da HbA.

É de notar que o controlo da expressão da HbF é um sistema dinâmico que tem por base a transcrição de diversos genes já identificados e de outros cuja implicação ou mecanismo de atuação no *HbF switch* são desconhecidos pela comunidade científica⁵. Como tal, as relações diretas de causa-efeito entre dois (ou mais) genes diferentes não é sempre passível de ser realizada neste contexto. Assim, para justificar os resultados acima descritos e correlacionar em geral os obtidos nestes dois estudos deveria confirmar-se o *status* de metilação e/ou acetilação da região promotora de determinado gene da globina ou regulador da HbF associado a alterações no nível de mRNA pós-tratamento de determinado modulador epigenético (DNMT ou HDAC), para entender se este último alterou diretamente a sua transcrição. Exemplificando, apenas será possível afirmar que após uma exposição de 72h à GN a 100ng/mL a transcrição do *BCL11A* foi inibida por aumento transcricional da *DNMT1* se for verificado um aumento da metilação da região promotora deste regulador da HbF após tratamento.

É ainda importante realçar que a síntese proteica leva tempo e que as mudanças na transcrição de determinados genes (como as *DNMT* ou *HDAC*) podem levar algum tempo até afetar a respetiva proteína resultante e mais ainda para se obter impacto a nível da transcrição de outros genes (como os das globinas ou reguladores da HbF).

O efeito temporal torna-se particularmente evidente neste estudo e no referido¹⁰⁷ quando se aumenta ou diminui a expressão de determinado repressor ou ativador transcricional da γ -globina, mas não se verificam efeitos no nível de mRNA da *HBG1* e *HBG2*.

Após 72h, a GN a 100ng/mL vai aumentar expressão da *DNMT1*, *DNMT3A* e *HDAC1* (repressoras da HbF), mas não se verifica impacto a nível da *HBG1* ou *HBG2*. De forma semelhante, na concentração intermediária da GN (250 ng/mL) verifica-se aumento transcricional das duas primeiras mencionadas metiltransferases, sem impacto a nível dos genes das γ -globinas.

Num tempo de exposição de 96h, a EGCG na menor concentração causa aumento transcricional da *HDAC2* que fora previamente reportada como repressora da expressão de HbF³³, mas este tratamento não se associa a uma diminuição dos níveis celulares de mRNA do gene *HBG1* ou *HGB2*. Na maior concentração e tempo de exposição, a GN demonstra capacidade de inibir simultaneamente a *DNMT1* e o *KLF1* (supressores da HbF), não se verificando aumento transcricional dos genes da γ -globina.

As variações no mRNA obtidas pela transcrição de determinado gene podem quebrar a relação direta e proporcional entre o transcrito e os níveis de proteína obtidos¹³⁸. Em fases dinâmicas da célula (como a diferenciação, a resposta ao stress ou tratamento com determinado composto) os processos pós-transcrição podem causar grandes desvios nesta correlação, fazendo com que os níveis de transcrito por si só não sejam suficientes para prever os níveis de proteína obtidos¹³⁸. Como tal, uma possível justificação para que o aumento ou diminuição do nível de determinado gene das *DNMT* ou *HDAC* implicado no *HbF switch* como repressor da HbF não cause impacto a nível transcricional da γ -globina pode ser o tempo de análise da expressão génica não ser suficientemente longo para se detetarem mudanças transcricionais, porque o nível de mRNA do modulador epigenético não é um “espelho” da quantidade de proteína conseguida após a sua transcrição.

Tendo em conta os resultados obtidos e a justificação previamente apresentada, considera-se que futuramente com o aumento dos tempos de exposição dos dois compostos poderia obter-se resultados mais significantes a nível dos genes *HBG1* e *HBG2*. Um aumento do tempo de exposição poderia permitir associar uma alteração na transcrição dos repressores da HbF a uma diminuição ou aumento da sua proteína efetora e assim, obterem-se efeitos na expressão dos genes da γ -globina e conseqüente indução da HbF.

Contudo, tornar-se-ia interessante adicionar pelo menos um tempo de exposição celular à EGCG e GN mais diminuto (24h) tendo em conta que tanto no nível de mRNA dos

moduladores epigenéticos deste estudo como da transcrição dos genes da globina e reguladores da HbF obtidos no estudo anteriormente realizado¹⁰⁷, se verifica maior impacto génico às 72h do que após 96h. Um estudo anteriormente realizado reporta que as concentrações plasmáticas máximas após suplementação com EGCG em indivíduos saudáveis ocorrem 1 a 2 horas após o seu consumo, diminuindo gradualmente estes níveis até serem indetetáveis às 24 horas¹¹⁷. Um segundo estudo relata que a suplementação de indivíduos saudáveis de doses de 50mg de GN durante 9 dias despoleta, tanto no primeiro como ao último dia da toma oral, uma redução drástica da concentração plasmática deste composto após cerca de 25 horas¹¹⁵. Sendo o *clearance* plasmático destes compostos naturais no ser humano de aproximadamente 24 horas, seria interessante averiguar se este tempo de exposição produz efeitos génicos relevantes quanto ao potencial indutor da HbF. Por sua vez, dois estudos já demonstraram a possível eficácia da EGCG e da GN em aumentar as concentrações da HbF em humanos através da ingestão de extrato de chá verde ou de alimentos ricos em soja, respetivamente. Um estudo realizado pelo H&TRC demonstra que a ingestão diária prolongada (90 dias) de cápsulas de extrato de chá verde (225mg/cada) causa aumento significativo da concentração de HbF²². Já um estudo de 1979 realizou 3 dietas diferentes à base de soja (2,5 , 4,0 ou 5,5 g/kg/dia) a 39 recém-nascidos durante os primeiros 4 meses das suas vidas¹³⁹. Após 4 meses, os níveis serológicos de γ -globina foram diretamente proporcionais às concentrações de soja aplicadas, estando as crianças que realizaram o consumo de 5,5 g/kg/dia de soja associados a maior nível desta globina¹³⁹. Resumidamente neste estudo, a EGCG não aparenta afetar extensamente o nível de mRNA das *DNMT*, mas demonstra estimular a expressão da *HDAC2* (reconhecida como repressora da HbF) na menor concentração e ambos os tempos de exposição aplicados na células K562. Por outro lado, a GN demonstra estimular a transcrição de diversos repressores da γ -globina no menor tempo de exposição, nomeadamente da *DNMT1* em todas as concentrações e da *DNMT3A* na concentração intermédia (250 ng/mL). Por outro lado, às 96h e na concentração de 500ng/mL, aparenta diminuir os níveis de mRNA da *DNTM1*. Quanto às HDAC, a GN aparenta afetar a transcrição de reconhecidos inibidores da HbF conforme a concentração aplicada às 72h, estimulando a transcrição da *HDAC1* na menor concentração e inibindo a expressão da *HDAC1* e *HDAC3* na maior concentração. Às 96h afeta também os níveis de mRNA da *HDAC3* na concentração intermédia (250ng/mL) e adicionalmente, da *HDAC2* na maior concentração.

Consegue assim entender-se com este estudo que, em células K562, a EGCG e a GN afetam a transcrição de moduladores epigenéticos implicados no seu potencial indutor da HbF (*DNMT* e *HDAC*) pelo que futuramente, poderá ser proveitoso estudar-se o mecanismo de atuação na regulação da HbF destes compostos em células eritrocitárias humanas.

5. Capítulo 5 - Considerações finais

5.1. Conclusões

Resumidamente, os dois compostos naturais estudados aparentam causar impacto na transcrição de moduladores epigenéticos previamente implicados na regulação da HbF. Verifica-se que a EGCG e a GN despoletam modulação epigenética em células K562 concomitante com efeitos na transcrição dos genes das globinas e reguladores da γ -globina previamente reportados, apontando assim para o seu potencial indutor epigenético da HbF. Em suma, obtiveram-se os seguintes resultados no presente estudo:

- a EGCG associa-se a efeitos transcricionais diminutos na metilação e mais extensos na acetilação, afetando os genes *HDAC2* e *HDAC8*.
- a GN causa uma resposta divergente com a dose às 72h, afetando sempre a transcrição do gene *DNMT1* e às 96h, demonstra-se também capaz de inibir a expressão deste gene na maior concentração. Os seus efeitos transcricionais são mais extensos na desacetilação (todos os genes das *HDAC*), em ambos os tempos de exposição.
- os dois compostos associam-se a uma dose-resposta não monotónica (DRNM);
- na maior concentração (500ng/mL), tanto a GN após 72h como EGCG após 96h conseguem inibir a transcrição da *HDAC3* e *HDAC2* (repressores da HbF), respetivamente, em níveis superiores aos obtidos para a HU;
- a HU aparenta atuar exclusivamente pela modulação génica da *DNMT3A* em ambos os tempos de exposição. Vai ainda inibir a transcrição da *HDAC8* às 72h e adicionalmente, da *HDAC1* às 96h, sugerindo assim vias de atuação temporal distintas;
- o gene *HDAC8* tem os seus níveis de mRNA modificados em qualquer um dos tratamentos celulares realizados (EGCG, GN e HU) pelo que pode estar implicado na regulação da HbF.

Em suma, tanto a EGCG como a GN podem atuar a nível epigenético perante o seu potencial indutor de HbF.

A EGCG e a GN podem atuar como indutores epigenéticos da HbF de forma semelhante à HU, representando uma futura alternativa terapêutica nas hemoglobinopatias e associando-se a menores efeitos secundários. Mais ainda, por serem compostos naturais presentes na dieta, podem ser mais facilmente fornecidos aos doentes de países em desenvolvimento com maior escassez de recursos.

Futuramente, os efeitos específicos destes compostos poderão ser estudados em células progenitoras eritrocitárias humanas, para conseguir entender objetivamente o potencial da

sua aplicação como indutores da HbF. Aspira-se a se possa recorrer a estes compostos para desenvolver ensaios clínicos e entender o seu mecanismo de atuação diretamente em doentes com hemoglobinopatias, uma das doenças monogénicas mais comuns na atualidade e cuja prevalência deverá aumentar futuramente, exigindo alternativas terapêuticas menos perigosas e com ampla distribuição mundial.

5.2. Estudos futuros

A regulação epigenética também realizada pelos microRNA (miRNA) que tem a capacidade de se ligarem a fatores transcricionais, inibindo-os^{44,46}. Assim, um estudo futuro poderá avaliar o nível de expressão génica dos microRNA após a exposição celular à EGCG e GN, para entender de forma mais extensa possível impacto epigenético destes compostos. Seria ainda interessante realizar a exposição das células K562 a estes compostos naturais e a inibidores específicos de vias de sinalização moleculares (ex. MAPK e PI3K/Akt), para entender o potencial mecanismo de atuação molecular de cada um.

Estudos anteriores realizados em fígados fibróticos de ratinhos¹⁴⁰, linhagem celular e ratinhos com cancro prostático^{141,142}, pré-adipócitos implicados no desenvolvimento da obesidade¹⁴³ e queratinócitos ativados que libertam fatores causadores de inflamação da pele¹⁴⁴ demonstram que o uso combinado destes dois compostos naturais atenua em maior grau as mencionadas patologias que de forma individual. Como tal, seria interessante continuar o projeto e realizar a co-exposição de células da linhagem K562 à EGCG e GN de forma a averiguar se estes compostos podem atuar sinergicamente na indução da HbF.

O uso de células da linhagem celular imortalizada K562 pode ter eventual implicação na transposição dos resultados para seres humanos. Apesar do seu extenso uso no estudo de possíveis indutores da HbF, estas são incapazes de completar normal eritropoiese humana (não chegando a expressar maioritariamente a HbA) e uma baixa expressão do gene *BCL11A*³². Torna-se importante a realização de um futuro estudo que permita ultrapassar estas limitações e na qual se verifique o possível efeito da EGCG e GN em células precursoras eritrocitárias com normal eritropoiese (obtidas através da cultura em 2 fases do sangue periférico de pessoas saudáveis) e assim, expressão dos genes das globinas característicos dos adultos (nomeadamente na expressão de HbA) e níveis fisiológicos dos genes reguladores da HbF (como o *BCL11A*)¹⁴⁵.

6. Capítulo 6 - Referências bibliográficas

1. Williams TN, DJW. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. Published online 2012. doi:10.1101/cshperspect.a011692
2. Christianson A, Howson CP, Modell B. March of Dimes: global report on birth defects, the hidden toll of dying and disabled children. *Christ A Howson, CP Model B March Dimes Glob Rep birth defects hidden toll dying Disabl Child Res report March Dimes Birth Defects Found White Plains, USA*. Published online November 2005.
3. Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2011;108(31-32):532-540. doi:10.3238/arztebl.2011.0532
4. Iolascon A, De Franceschi L, Muckenthaler M, et al. EHA Research Roadmap on Hemoglobinopathies and Thalassemia: An Update. *HemaSphere*. 2019;3(3):e208-e208. doi:10.1097/HS9.0000000000000208
5. Sankaran VG, Orkin SH. The Switch from Fetal to Adult Hemoglobin. Published online 2013:1-14.
6. Shaukat I, Pudal A, Yassin S, Höti N, Mustafa S. Blessing in disguise: a case of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. *J community Hosp Intern Med Perspect*. 2018;8(6):380-381. doi:10.1080/20009666.2018.1536241
7. Chou Y-C, Chen R-L, Lai Z-S, Song J-S, Chao Y-S, Shen C-KJ. Pharmacological Induction of Human Fetal Globin Gene in Hydroxyurea-Resistant Primary Adult Erythroid Cells. *Mol Cell Biol*. 2015;35(14):2541-2553. doi:10.1128/MCB.00035-15
8. Paikari A, Sheehan V. Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2017;180. doi:10.1111/bjh.15021
9. Tun AM, Naing EE, Tun NM, Guevara E. A predictable but life-threatening complication of hydroxyurea in a patient with sickle cell anaemia: an experience learned from a Jehovah's Witness. *BMJ Case Rep*. 2015;2015:bcr2015211785. doi:10.1136/bcr-2015-211785
10. Radic J, Batinac T, Hadzisejdic I, Nacinovic-Duletic A, Valkovic T, Jonjic N. Concurrent basal cell and squamous cell carcinomas associated with hydroxyurea therapy. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2011;19(3):183-186.
11. Esteve E, Georgescu V, Heitzmann P, Martin L. Multiple skin and mouth squamous cell carcinomas related to long-term treatment with hydroxyurea. *Ann Dermatol Venereol*. 2001;128(8-9):919-921.
12. Sampson M, Archibong A, Powell A, et al. Perturbation of the Developmental Potential of Preimplantation Mouse Embryos by Hydroxyurea. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7:2033-2044. doi:10.3390/ijerph7052033
13. Ansong D, Akoto AO, Ocloo D, Ohene-Frempong K. Sickle cell disease: management options and challenges in developing countries. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;5(1):e2013062-e2013062. doi:10.4084/MJHID.2013.062
14. Vahid F, Zand H, Nosrat-Mirshekarlou E, Najafi R, Hekmatdoost A. The role dietary of bioactive

- compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: a review. *Gene*. 2015;562(1):8-15. doi:10.1016/j.gene.2015.02.045
15. Spagnuolo C, Russo GL, Orhan IE, et al. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. *Adv Nutr*. 2015;6(4):408-419. doi:10.3945/an.114.008052
 16. Tuli HS, Tuorkey MJ, Thakral F, et al. Molecular Mechanisms of Action of Genistein in Cancer: Recent Advances. *Front Pharmacol*. 2019;10:1336. doi:10.3389/fphar.2019.01336
 17. Sanaei M, Kavooosi F, Roustazadeh A, Golestan F. Effect of Genistein in Comparison with Trichostatin A on Reactivation of DNMTs Genes in Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Transl Hepatol*. 2018;6(2):141-146. doi:10.14218/JCTH.2018.00002
 18. Xie Q, Bai Q, Zou L-Y, et al. Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(5):422-431. doi:10.1002/gcc.22154
 19. Chu C, Deng J, Man Y, Qu Y. Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. *Biomed Res Int*. 2017;2017:5615647. doi:10.1155/2017/5615647
 20. Khan MA, Hussain A, Sundaram MK, et al. Epigallocatechin-3-gallate reverses the expression of various tumor-suppressor genes by inhibiting DNA methyltransferases and histone deacetylases in human cervical cancer cells. *Oncol Rep*. 2015;33(4):1976-1984. doi:10.3892/or.2015.3802
 21. Nandakumar V, Vaid M, Katiyar SK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis*. 2011;32(4):537-544. doi:10.1093/carcin/bgq285
 22. Ribeiro, Edna; Brito, Miguel; Delgadinho, Mariana; Sousa, Daniela; Matos, Elizabete; Galante, Heloísa; Santos R. Modulatory effect of Epigallocatechin-3-gallate and Genistein in key epigenetic and fetal hemoglobin reactivators genes. *[Manuscrito submetido para publicação]*.
 23. Frey RCR. Hemoglobin and the Heme Group: Metal Complexes in the Blood for Oxygen Transport. Department of Chemistry, Washington University. Published 1998. Accessed November 17, 2020. http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/CourseTutorials/Tutorials/Hemoglobin/hemo_06.htm
 24. Grosveld F, van Assendelft GB, Greaves DR, Kollias G. Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell*. 1987;51(6):975-985. doi:10.1016/0092-8674(87)90584-8
 25. Donze D, Townes TM, Bieker JJ. Role of erythroid Kruppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching. *J Biol Chem*. 1995;270(4):1955-1959. doi:10.1074/jbc.270.4.1955
 26. Hesslein DG, Schatz DG. Factors and forces controlling V(D)J recombination. *Adv Immunol*. 2001;78:169-232. doi:10.1016/s0065-2776(01)78004-2
 27. Fan A, Hossain M, Stees J, Gavrilova E, Bungert J. Regulation of erythroid cell differentiation by transcription factors, chromatin structure alterations, and noncoding RNA. In: ; 2015:237-264. doi:10.1016/B978-0-12-799958-6.00011-1

28. Wienert B, Martyn G, Funnell A, Quinlan K, Crossley M. Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for β -Hemoglobinopathies. *Trends Genet.* 2018;34. doi:10.1016/j.tig.2018.09.004
29. Galarneau G, Palmer CD, Sankaran VG, Orkin SH, Hirschhorn JN, Lettre G. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nat Genet.* 2010;42(12):1049-1051. doi:10.1038/ng.707
30. Menzel S, Garner C, Gut I, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat Genet.* 2007;39(10):1197-1199. doi:10.1038/ng2108
31. Uda M, Galanello R, Sanna S, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(5):1620-1625. doi:10.1073/pnas.0711566105
32. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science.* 2008;322(5909):1839-1842. doi:10.1126/science.1165409
33. Bradner JE, Mak R, Tanguturi SK, et al. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(28):12617-12622. doi:10.1073/pnas.1006774107
34. Xu J, Peng C, Sankaran VG, et al. Correction of sickle cell disease in adult mice by interference with fetal hemoglobin silencing. *Science.* 2011;334(6058):993-996. doi:10.1126/science.1211053
35. Sankaran VG, Xu J, Orkin SH. Advances in the understanding of haemoglobin switching. *Br J Haematol.* 2010;149(2):181-194. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08105.x
36. Zhou D, Liu K, Sun C-W, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet.* 2010;42(9):742-744. doi:10.1038/ng.637
37. Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, et al. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet.* 2010;42(9):801-805. doi:10.1038/ng.630
38. Gallienne AE, Dreau HMP, Schuh A, Old JM, Henderson S. Ten novel mutations in the erythroid transcription factor KLF1 gene associated with increased fetal hemoglobin levels in adults. *Haematologica.* 2012;97(3):340-343. doi:10.3324/haematol.2011.055442
39. Thein SL, Menzel S, Peng X, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(27):11346-11351. doi:10.1073/pnas.0611393104
40. Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood.* 2011;117(15):3945-3953. doi:10.1182/blood-2010-11-316893
41. Jiang J, Best S, Menzel S, et al. cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. *Blood.* 2006;108(3):1077-1083. doi:10.1182/blood-2006-01-008912
42. Ivaldi MS, Diaz LF, Chakalova L, Lee J, Krivega I, Dean A. Fetal gamma-globin genes are regulated by the BGLT3 long noncoding RNA locus. *Blood.* 2018;132(18):1963-1973.

- doi:10.1182/blood-2018-07-862003
43. Blobel GA, Crossley M. Charting a noncoding gene for γ -globin activation. *Blood*. 2018;132(18):1865-1867. doi:10.1182/blood-2018-09-873620
 44. Costa D, Capuano M, Sommese L, Napoli C. Impact of epigenetic mechanisms on therapeutic approaches of hemoglobinopathies. *Blood Cells Mol Dis*. 2015;55(2):95-100. doi:10.1016/j.bcmd.2015.05.004
 45. Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure*. 2008;16(3):341-350. doi:10.1016/j.str.2008.01.004
 46. Ginder GD. Epigenetic regulation of fetal globin gene expression in adult erythroid cells. *Transl Res*. 2015;165(1):115-125. doi:10.1016/j.trsl.2014.05.002
 47. Kiefer CM, Hou C, Little JA, Dean A. Epigenetics of beta-globin gene regulation. *Mutat Res*. 2008;647(1-2):68-76. doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.07.014
 48. Xu J, Bauer DE, Kerényi MA, et al. Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by BCL11A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(16):6518-6523. doi:10.1073/pnas.1303976110
 49. Zhao Q, Rank G, Tan YT, et al. PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(3):304-311. doi:10.1038/nsmb.1568
 50. Park S-Y, Kim J-S. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp Mol Med*. 2020;52(2):204-212. doi:10.1038/s12276-020-0382-4
 51. Mankidy R, Faller D V, Mabaera R, et al. Short-chain fatty acids induce gamma-globin gene expression by displacement of a HDAC3-NCoR repressor complex. *Blood*. 2006;108(9):3179-3186. doi:10.1182/blood-2005-12-010934
 52. Somervaille T. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. *J R Soc Med*. 2001;94(11):602-603. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1282256/>
 53. Brancaleoni V, Di Pierro E, Motta I, Cappellini MD. Laboratory diagnosis of thalassemia. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(S1):32-40. doi:<https://doi.org/10.1111/ijlh.12527>
 54. Fibach E, Rachmilewitz EA. Pathophysiology and treatment of patients with beta-thalassemia - an update. *F1000Research*. 2017;6:2156. doi:10.12688/f1000research.12688.1
 55. Olivieri NF. The beta-thalassemias. *N Engl J Med*. 1999;341(2):99-109. doi:10.1056/NEJM199907083410207
 56. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5(1):11. doi:10.1186/1750-1172-5-11
 57. Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. Thalassaemia. *Lancet (London, England)*. 2018;391(10116):155-167. doi:10.1016/S0140-6736(17)31822-6
 58. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9757):2018-2031. doi:10.1016/S0140-6736(10)61029-X
 59. Field JJ, Nathan DG. Advances in sickle cell therapies in the hydroxyurea era. *Mol Med*. 2014;20 Suppl 1(Suppl 1):S37-S42. doi:10.2119/molmed.2014.00187
 60. Houwing ME, de Pagter PJ, van Beers EJ, et al. Sickle cell disease: Clinical presentation and

- management of a global health challenge. *Blood Rev.* 2019;37:100580. doi:10.1016/j.blre.2019.05.004
61. Biswas T. Global burden of sickle cell anaemia is set to rise by a third by 2050. *BMJ.* 2013;(347):f4676.
 62. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sickle cell disease. *Lancet (London, England).* 2017;390(10091):311-323. doi:10.1016/S0140-6736(17)30193-9
 63. Dreuzy E, Bhukhai K, Leboulch P, Payen E. Current and future alternative therapies for beta-thalassemia major. *Biomed J.* 2016;39(1):24-38. doi:10.1016/j.bj.2015.10.001
 64. EMA (European Medicine Agency). Adakveo. Published 2020. Accessed May 18, 2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/adakveo>
 65. EMA (European Medicine Agency). Xyndari: Withdrawal of the marketing authorisation application. Published 2019. Accessed May 18, 2021. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/withdrawn-applications/xyndari>
 66. Marsella M, Borgna-Pignatti C. Transfusional iron overload and iron chelation therapy in thalassemia major and sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28(4):703-727, vi. doi:10.1016/j.hoc.2014.04.004
 67. Storb RF, Lucarelli G, McSweeney PA, Childs RW. Hematopoietic cell transplantation for benign hematological disorders and solid tumors. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr.* Published online 2003:372-397. doi:10.1182/asheducation-2003.1.372
 68. WATSON J. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. *Am J Med Sci.* 1948;215(4):419-423. doi:10.1097/00000441-194804000-00008
 69. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001;79(8):704-712.
 70. Perrine SP, Pace BS, Faller D V. Targeted fetal hemoglobin induction for treatment of beta hemoglobinopathies. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28(2):233-248. doi:10.1016/j.hoc.2013.11.009
 71. Sauntharajah Y, Hillery CA, Lavelle D, et al. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. *Blood.* 2003;102(12):3865-3870. doi:https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1738
 72. Atweh GF, Sutton M, Nassif I, et al. Sustained induction of fetal hemoglobin by pulse butyrate therapy in sickle cell disease. *Blood.* 1999;93(6):1790-1797.
 73. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4:18010. doi:10.1038/nrdp.2018.10
 74. Matte A, Zorzi F, Mazzi F, Federti E, Olivieri O, De Franceschi L. New Therapeutic Options for the Treatment of Sickle Cell Disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2019;11(1):e2019002-e2019002. doi:10.4084/MJHID.2019.002
 75. Musallam KM, Sankaran VG, Cappellini MD, Duca L, Nathan DG, Taher AT. Fetal hemoglobin levels and morbidity in untransfused patients with beta-thalassemia intermedia. *Blood.* 2012;119(2):364-367. doi:10.1182/blood-2011-09-382408
 76. Wykes C, Rees DC. The safety and efficacy of hydroxycarbamide in infants with sickle cell

- anemia. *Expert Rev Hematol*. 2011;4(4):407-409. doi:10.1586/ehm.11.40
77. Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest*. 2003;111(2):231-239. doi:10.1172/JCI16672
 78. Sahoo LK, Kullu BK, Patel S, et al. Study of Seminal Fluid Parameters and Fertility of Male Sickle Cell Disease Patients and Potential Impact of Hydroxyurea Treatment. *J Assoc Physicians India*. 2017;65(6):22-25.
 79. Hernandez-Boluda J-C, Alvarez-Larran A, Gomez M, et al. Clinical evaluation of the European LeukaemiaNet criteria for clinicohaematological response and resistance/intolerance to hydroxycarbamide in essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 2011;152(1):81-88. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08430.x
 80. Internullo M, Giannelli V, Sardo L, et al. Hydroxyurea-induced interstitial pneumonitis: case report and review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(2):190-193.
 81. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med (Baltim)*. 1992;21(3):334-350. doi:https://doi.org/10.1016/0091-7435(92)90041-F
 82. Yuan J-M. Cancer prevention by green tea: evidence from epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 2013;98(6 Suppl):1676S-1681S. doi:10.3945/ajcn.113.058271
 83. Das S, Tanwar J, Hameed S, Fatima Z. Antimicrobial potential of epigallocatechin-3-gallate (EGCG): A green tea polyphenol. 2014;2:167-174.
 84. Min K-J, Kwon TK. Anticancer effects and molecular mechanisms of epigallocatechin-3-gallate. *Integr Med Res*. 2014;3(1):16-24. doi:10.1016/j.imr.2013.12.001
 85. Ohnishi ST, Ohnishi T, Ogunmola GB. Green Tea Extract and Aged Garlic Extract Inhibit Anion Transport and Sickle Cell Dehydration in Vitro. *Blood Cells, Mol Dis*. 2001;27(1):148-157. doi:https://doi.org/10.1006/bcmd.2000.0368
 86. Hussain S, Ashafaq M. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications in cervical cancer. *J Cancer Prev Curr Res*. 2018;9. doi:10.15406/jcpcr.2018.09.00345
 87. Kato K, Long NK, Makita H, et al. Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *Br J Cancer*. 2008;99(4):647-654. doi:10.1038/sj.bjc.6604521
 88. Fang M, Chen D, Yang CS. Dietary Polyphenols May Affect DNA Methylation. *J Nutr*. 2007;137(1):223S-228S. doi:10.1093/jn/137.1.223S
 89. Fang MZ, Wang Y, Ai N, et al. Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits DNA Methyltransferase and Reactivates Methylation-Silenced Genes in Cancer Cell Lines. *Cancer Res*. 2003;63(22):7563 LP - 7570. http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/22/7563.abstract
 90. Lee WJ, Shim J-Y, Zhu BT. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol Pharmacol*. 2005;68(4):1018-1030. doi:10.1124/mol.104.008367
 91. Wong CP, Nguyen LP, Noh SK, Bray TM, Bruno RS, Ho E. Induction of regulatory T cells by green tea polyphenol EGCG. *Immunol Lett*. 2011;139(1-2):7-13. doi:10.1016/j.imlet.2011.04.009

92. Pandey M, Shukla S, Gupta S. Promoter demethylation and chromatin remodeling by green tea polyphenols leads to re-expression of GSTP1 in human prostate cancer cells. *Int J cancer*. 2010;126(11):2520-2533. doi:10.1002/ijc.24988
93. Moseley VR, Morris J, Knackstedt RW, Wargovich MJ. Green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate, contributes to the degradation of DNMT3A and HDAC3 in HCT 116 human colon cancer cells. *Anticancer Res*. 2013;33(12):5325-5333. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24324066>
94. Lampe JW, Nishino Y, Ray RM, et al. Plasma isoflavones and fibrocystic breast conditions and breast cancer among women in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol*. 2007;16(12):2579-2586. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0368
95. Kurahashi N, Iwasaki M, Sasazuki S, Otani T, Inoue M, Tsugane S. Soy product and isoflavone consumption in relation to prostate cancer in Japanese men. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev a Publ Am Assoc Cancer Res cosponsored by Am Soc Prev Oncol*. 2007;16(3):538-545. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0517
96. Dixon RA, Ferreira D. Genistein. *Phytochemistry*. 2002;60(3):205-211. doi:10.1016/s0031-9422(02)00116-4
97. Klein CB, King AA. Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;224(1):1-11. doi:10.1016/j.taap.2007.06.022
98. Majid S, Dar AA, Shahryari V, et al. Genistein reverses hypermethylation and induces active histone modifications in tumor suppressor gene B-Cell translocation gene 3 in prostate cancer. *Cancer*. 2010;116(1):66-76. doi:10.1002/cncr.24662
99. Li H, Xu W, Huang Y, Huang X, Xu L, Lv Z. Genistein demethylates the promoter of CHD5 and inhibits neuroblastoma growth in vivo. *Int J Mol Med*. 2012;30(5):1081-1086. doi:10.3892/ijmm.2012.1118
100. Bilir B, Sharma N V, Lee J, et al. Effects of genistein supplementation on genome-wide DNA methylation and gene expression in patients with localized prostate cancer. *Int J Oncol*. 2017;51(1):223-234. doi:10.3892/ijo.2017.4017
101. Sundaram MK, Unni S, Somvanshi P, et al. Genistein Modulates Signaling Pathways and Targets Several Epigenetic Markers in HeLa Cells. *Genes (Basel)*. 2019;10(12). doi:10.3390/genes10120955
102. Li Y, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO. Genistein depletes telomerase activity through cross-talk between genetic and epigenetic mechanisms. *Int J cancer*. 2009;125(2):286-296. doi:10.1002/ijc.24398
103. Fortin MF. *Fundamentos e Etapas Do Processo de Investigação*. Loures: Lusodidacta; 2009.
104. Fibach E. Cell culture and animal models to screen for promising fetal hemoglobin-stimulating compounds. *Semin Hematol*. 2001;38(4):374-381. doi:10.1016/s0037-1963(01)90032-0
105. Koefler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*. 1980;56(3):344-350. doi:10.1182/blood.V56.3.344.344
106. Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG. K562 - a human erythroleukemic cell line. *Int J cancer*.

- 1979;23(2):143-147. doi:10.1002/ijc.2910230202
107. Matos, E. *Natural compounds with the capacity to reactivate the gene of gamma-globin and induction of fetal hemoglobin - In vitro test*. [Dissertação de Mestrado, ESTeSL e ISEL]. Repositório Científico do IPL. <http://hdl.handle.net/10400.21/13367>.
 108. Ganai AA, Farooqi H. Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies. *Biomed Pharmacother*. 2015;76:30-38. doi:10.1016/j.biopha.2015.10.026
 109. European Union of Cell Cultures (ECACC). *Fundamental Techniques in Cell Culture - Laboratory Handbook*. 4ª. (Sigma, ed.). Merck; 2018.
 110. Promega Corporation. *Instructions of Use of the CellTiter-Blue® Viability Assay (TB317)*.; 2016.
 111. Thermo Fisher Scientific. *User Guide Manual: Qubit® RNA HS Assay Kits for Use with the Qubit® Fluorometer (MAN0002327)*.; 2015.
 112. Thermo Fisher Scientific. *Protocol for TaqMan® Reverse Transcription Reagents (MAN0009791)*.; 2014.
 113. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005;39(1):75-85. doi:10.2144/05391RV01
 114. Messing E, Gee JR, Saltzstein DR, et al. A phase 2 cancer chemoprevention biomarker trial of isoflavone G-2535 (genistein) in presurgical bladder cancer patients. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(4):621-630. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0455
 115. Zeng X, Feng Y, Yang L, et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of genistein capsules in healthy chinese subjects: A phase I, randomized, open-label study. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2008;69(4):318-333. doi:10.1016/j.curtheres.2008.08.006
 116. Chow H-HS, Cai Y, Hakim IA, et al. Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res*. 2003;9(9):3312-3319.
 117. Mereles D, Hunstein W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: More Pitfalls than Promises? *Int J Mol Sci*. 2011;12(9):5592-5603. doi:10.3390/ijms12095592
 118. Wolfram S. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *J Am Coll Nutr*. 2007;26(4):373S-388S. doi:10.1080/07315724.2007.10719626
 119. Wu F, Sun H, Kluz T, Clancy HA, Kiok K, Costa M. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects against chromate-induced toxicity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;258(2):166-175. doi:10.1016/j.taap.2011.10.018
 120. Vinjamur DS, Bauer DE, Orkin SH. Recent progress in understanding and manipulating haemoglobin switching for the haemoglobinopathies. *Br J Haematol*. 2018;180(5):630-643. doi:10.1111/bjh.15038
 121. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ Health*. 2015;14:13. doi:10.1186/1476-069X-14-13
 122. Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the “natural” selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999;85(1):47-51. doi:10.1016/s0301-2115(98)00281-4
 123. Xu Z, Liu J, Wu X, Huang B, Pan X. Nonmonotonic responses to low doses of xenoestrogens: A

- review. *Environ Res.* 2017;155:199-207. doi:10.1016/j.envres.2017.02.018
124. Dang Z-C, Audinot V, Papapoulos SE, Boutin JA, Löwik CWGM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem.* 2003;278(2):962-967. doi:10.1074/jbc.M209483200
 125. Chen J, Chen L, Lu T, et al. ERα36 is an effective target of epigallocatechin-3-gallate in hepatocellular carcinoma. 2019;12(9):3222-3234.
 126. Chuang JC, Yoo CB, Kwan JM, et al. Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(10):1515-1520. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0172
 127. Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 2006;66(5):2794-2800. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2821
 128. Roosjen M, McColl B, Kao B, Gearing LJ, Blewitt ME, Vadolas J. Transcriptional regulators Myb and BCL11A interplay with DNA methyltransferase 1 in developmental silencing of embryonic and fetal β-like globin genes. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2014;28(4):1610-1620. doi:10.1096/fj.13-242669
 129. Ciesielski O, Biesiekierska M, Balcerczyk A. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Alters Histone Acetylation and Methylation and Impacts Chromatin Architecture Profile in Human Endothelial Cells. *Mol.* 2020;25(10). doi:10.3390/molecules25102326
 130. Walker AL, Steward S, Howard TA, et al. Epigenetic and molecular profiles of erythroid cells after hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood.* 2011;118(20):5664-5670. doi:10.1182/blood-2011-07-368746
 131. Ashley-Koch AE, Garrett M, Soldano K, Barber LA, Telen MJ. Hydroxyurea Induces Genome-Wide Epigenetic Changes In Sickle Cell Disease. *Blood.* 2010;116(21):2670. doi:10.1182/blood.V116.21.2670.2670
 132. Platt OS, Orkin SH, Dover G, Beardsley GP, Miller B, Nathan DG. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *J Clin Invest.* 1984;74(2):652-656. doi:10.1172/JCI111464
 133. Hollenbach PW, Nguyen AN, Brady H, et al. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One.* 2010;5(2):e9001. doi:10.1371/journal.pone.0009001
 134. Silva LG, Ferguson BS, Avila AS, Faciola AP. Sodium propionate and sodium butyrate effects on histone deacetylase (HDAC) activity, histone acetylation, and inflammatory gene expression in bovine mammary epithelial cells. *J Anim Sci.* 2018;96(12):5244-5252. doi:10.1093/jas/sky373
 135. McElveen RL, Lou TF, Reese K, Xia S, Baliga BS, Pace BS. Erk pathway inhibitor U0126 induces gamma-globin expression in erythroid cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2005;51(2):215-227.
 136. Yao Y, Hao F, Tang L-C, Xu X-H, Jin L. Downregulation of HDAC8 expression decreases CD163 levels and promotes the apoptosis of macrophages by activating the ERK signaling pathway in recurrent spontaneous miscarriage. *Mol Hum Reprod.* 2020;26(7):521-531. doi:10.1093/molehr/gaaa035

137. Wu D, Liu Z, Li J, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the growth and increases the apoptosis of human thyroid carcinoma cells through suppression of EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway. *Cancer Cell Int.* 2019;19(1):43. doi:10.1186/s12935-019-0762-9
138. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell.* 2016;165(3):535-550. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014
139. Zoppi G, Zamboni G, Bassani N, Vazzoler G. Gammaglobulin level and soy-protein intake in early infancy. *Eur J Pediatr.* 1979;131(1):61-69. doi:10.1007/BF00442786
140. Zhuo L, Liao M, Zheng L, et al. Combination therapy with taurine, epigallocatechin gallate and genistein for protection against hepatic fibrosis induced by alcohol in rats. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(10):1802-1810. doi:10.1248/bpb.b12-00548
141. Hsieh T-C, Wu JM. Targeting CWR22Rv1 prostate cancer cell proliferation and gene expression by combinations of the phytochemicals EGCG, genistein and quercetin. *Anticancer Res.* 2009;29(10):4025-4032.
142. Zhou J-R, Yu L, Zhong Y, Blackburn GL. Soy phytochemicals and tea bioactive components synergistically inhibit androgen-sensitive human prostate tumors in mice. *J Nutr.* 2003;133(2):516-521. doi:10.1093/jn/133.2.516
143. Ahmed B, Liu S, Si H. Antiadipogenic Effects and Mechanisms of Combinations of Genistein, Epigallocatechin-3-Gallate, and/or Resveratrol in Preadipocytes. *J Med Food.* 2016;20(2):162-170. doi:10.1089/jmf.2016.0115
144. Trompezinski S, Denis A, Schmitt D, Viac J. Comparative effects of polyphenols from green tea (EGCG) and soybean (genistein) on VEGF and IL-8 release from normal human keratinocytes stimulated with the proinflammatory cytokine TNFalpha. *Arch Dermatol Res.* 2003;295(3):112-116. doi:10.1007/s00403-003-0402-y
145. Orkin Debscksh. Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the β -globin disorders. *Blood.* 2012;120(15). doi:10.1182/blood-2012-06-292078

7. Apêndices

7.1. Apêndice I: Caracterização das variáveis em estudo

Tabela 7.1 - Classificação e caracterização das variáveis em estudo.

Tipo de variável	Variável em estudo	Classificação	Escala de medida
Variáveis independentes	Composto usado na exposição celular	Qualitativa	Nominal
	Concentração do composto	Quantitativa	Discreta
	Tempo de exposição celular	Quantitativa	Discreta
Variáveis dependentes	Nível de expressão gênica celular	Quantitativa	Continua

7.2. Apêndice II: Fundamento e procedimento para isolamento e purificação de RNA total

7.2.1. Objetivo

Extrair, isolar e purificar pequenas quantidades de RNA total presente numa cultura celular.

7.2.2. Fundamento

As células K562 previamente tratadas com EGCG e GN, controlos positivo e negativos, foram transferidas das placas para tubos Falcon de 15mL e centrifugadas a 1500rpm, durante 5 minutos. Os pellets celulares foram então centrifugados duas vezes com 10mL de PBS, descartando-se o sobrenadante (com detritos celulares).

Iniciou-se então a extração do RNA total por adição de 175 μ L do tampão lise RNA às células lavadas, garantindo correta homogeneização por vórtex e/ ou pipetagem. Primeiramente, a amostra foi homogeneizada com este reagente que contém dodecil sulfato de sódio, guanina tiocianato e β -mercaptoetanol (BME). O primeiro composto atua na disrupção das membranas celulares e em conjunto com o segundo composto, na desnaturação das núcleo-proteínas que envolvem o RNA. Já o BME vai inativar as RNases (prevenindo a digestão do RNA) através da redução das pontes de dissulfureto da estrutura proteica, com desnaturação irreversível destas enzimas.

Adicionou-se então 350 μ L de tampão de diluição de RNA (cor azul) a 175 μ L de lizado, misturando-se por inversão do tubo. Colocou-se então num banho-maria de 70°C por 3 min, não incubando durante mais tempo para não comprometer a integridade do RNA a isolar e centrifugou-se de 12.000 a 14.000 x g por 10 min à temperatura ambiente (TA). A adição do tampão diluição de RNA causa a precipitação das proteínas celulares, mantendo o RNA isolado em solução. A centrifugação desta mistura permite a remoção dos restos celulares e proteínas precipitadas (que depositam no fundo do tubo).

Transferindo-se o sobrenadante (cor límpida) para novo conjunto da coluna de rotação, a adição de 200 μ L de etanol 95% permitiu precipitar seletivamente o RNA que se deposita e é adsorvido na membrana de sílica presente nas fibras de vidro do *spin basket* durante a seguinte centrifugação de 1min, 12.000 a 14.000 x g.

Após centrifugação, descarta-se o líquido do tubo coletor (com impurezas e detritos celulares) e volta a colocar-se o *spin basket* neste. Adicionou-se 600 μ L da solução de lavagem de RNA ao conjunto da coluna de rotação, centrifugando-se novamente durante o tempo e rotações por minutos previamente mencionadas. A adição da solução de lavagem de RNA permite remover os sais e impurezas presentes.

Segue-se o tratamento com a mistura da enzima DNase (previamente preparada para cada amostra com 40µL de tampão *Yellow Core*, 5µL de MnCl₂ a 0,09M e 5µL da enzima DNase I), para digestão do DNA genômico, diminuindo eventual contaminação e interferência deste na futura realização de técnica de amplificação molecular. Foram adicionados 50 µL da mistura de DNase diretamente ao *spin basket* de cada amostra e incubou-se durante 15 a 20 minutos à temperatura ambiente (TA).

Após esta incubação, adicionou-se 200 µL de Solução de *DNase Stop* ao Spin Basket e centrifugou-se a 12.000–14.000 x g durante 1 min, para interromper a ação desta enzima e prevenir que ocorra dano celular. Sem que fosse necessário esvaziar o tubo coletor, realizou-se uma lavagem com 600 µL de solução de lavagem de RNA, realizando-se uma primeira centrifugação nas condições anteriormente mencionadas e esvaziando-se o tubo coletor, e uma segunda com 250 µL desta mesma solução, desta vez centrifugada a alta velocidade por 2 min. Estas duas lavagens garantem total remoção de impurezas, após as quais o RNA total será eluído com 100 µL de água livre de nucleases da membrana para o novo tubo de 1,5 mL, centrifugando-se a 12.000–14.000 x g por 1 min e encontra-se pronto a usar (para os seguintes ensaios de análise pós-tratamento) ou armazenar a -70°C.

7.2.3.Procedimento

- **Preparação das células cultivadas em suspensão:**

- 1) Lavar as células com 1X PBS;
- 2) Recolher as células para um tubo de centrifugação. Realizar centrifugação a 500 x g durante 5 min. Descartar o sobrenadante.

- **Purificação do RNA por microcentrifugação:**

- 1) Remover uma coluna de rotação e tubo coletor para cada amostra a ser processada. Rotular cada tubo coletor;
- 2) Transferir a solução do lizado (de cor límpida) para um novo tubo de microcentrífuga por pipetagem. Evitar a perturbação dos detritos existentes;
- 3) Adicionar 200µL de etanol a 95% ao lizado e homogeneizar com a pipeta 3-4 vezes. Transferir esta mistura para o conjunto da coluna de rotação. Colocar o conjunto da coluna de rotação numa rack de tubos de microcentrífuga. Centrifugar de 12.000 a 14.000 x g durante 1min;
- 4) Pegar no spin basket do conjunto da coluna giratória e descartar o líquido do tubo coletor. Colocar o spin basket de novo no tubo coletor. Adicionar 600µL da solução de lavagem de RNA ao conjunto da coluna de rotação. Centrifugar a 12.000-14.000 x g durante 1min;
- 5) Para cada isolamento a ser realizado, preparar a mistura de incubação de DNase com 40µL de tampão *Yellow Core*, 5µL de MnCl₂ a 0,09M e 5µL da enzima DNase I, por

amostra, num tubo estéril (pela ordem mencionada). Preparar apenas a quantidade necessária de mistura de incubação de DNase e pipetar cuidadosamente cada componente. Homogeneizar com pipetagem suave, não vortexar. Manter a DNase I no gelo enquanto estiver a descongelar. Aplicar 50µL desta mistura de incubação de DNase preparada no momento e colocar diretamente na membrana dentro do Spin Basket. A sua cor amarela permite verificar se a solução cobre completamente a membrana;

- 6) Incubar por 15 minutos a 20–25°C. Após esta incubação, adicionar 200 µL de Solução de DNase Stop ao Spin Basket e centrifugar a 12.000–14.000 x g durante 1 min. Não é necessário esvaziar o tubo coletor antes do próximo passo;
- 7) Adicionar 600µL de solução de lavagem de RNA e centrifugar a solução de 12.000 a 14.000 x g por 1 min;
- 8) Esvaziar o tubo coletor e adicionar 250µL de solução de lavagem de RNA, centrifugando em alta velocidade por 2 min;
- 9) Remover a tampa do Spin Basket através de um movimento de rotação;
- 10) Para cada amostra, remover um tubo de eluição de 1,5 mL. Transfiri o Spin Basket do tubo coletor para o tubo de eluição e adicionar 100µL de água livre de nucleases à membrana. Certificar que a superfície da membrana está completamente coberta com a água. Colocar os conjuntos do cesto rotativo na centrífuga com as tampas dos tubos de eluição voltadas para fora. Centrifugar a 12.000–14.000 x g por 1 minuto. Remover e descartar o Spin Basket. Tapar o tubo de eluição que contém o RNA purificado e armazenar a –70°C.

Procedimento adaptado de: Brisco P, Sankbeil J, Kephart D. RNA Purification: A Rapid and Versatile Protocol for the Isolation of Total RNA. *Promega Notes*. January 1997:7.

7.3. Apêndice III: Fundamento e procedimento para quantificação do RNA total

7.3.1. Fundamento

Neste ensaio, faz-se uso do reagente Qubit® RNA HS que contém um composto fluorescente que quando livre não imite fluorescência mas, quando se liga a um ácido nucleico (RNA) vai aumentar a sua fluorescência. Esta que pode ser detetada através de um fluorómetro e será diretamente proporcional à concentração de RNA presente na amostra¹¹¹.

7.3.2. Procedimento

- 1) Preparar o número de tubos PCR de 0,5mL necessários para as amostras e 2 padrões Qubit® (estes últimos disponíveis no kit a usar), rotulando cada um;
- 2) Preparar a solução de trabalho necessária para as amostras e padrões num tubo de plástico transparente (e não de vidro) através da diluição de 1 parte do reagente Qubit® RNA HS e de 199 partes do tampão Qubit® RNA HS (fator diluição 200);
- 3) Adicionar 190µL de solução trabalho a cada um dos tubos para os padrões;
- 4) Adicionar 10µL de cada padrão Qubit® no respetivo tubo e vortexar cada um durante 2 a 3 segundos, tendo o cuidado de não criar bolhas.
- 5) Adicionar a solução de trabalho de forma individual em cada tubo de amostra, adaptando o volume em cada uma para que o final seja de 200µL. Variando o volume da amostra de 1 a 20µL, o volume da solução de trabalho a adicionar pode estar entre os 180 e 199µL. Vortexar cada tubo durante 2 a 3 segundos;
- 6) Permitir que todos os tubos sofram uma incubação de 2 minutos à temperatura ambiente;
- 7) Proceder à leitura de todos os tubos no fluorómetro Qubit ® 3.0, até 3 horas após incubação:
 - 7.1.) Iniciar-se a leitura pelos padrões, primeiro com o padrão #1 e em seguida, removendo este do instrumento e realizando a leitura do padrão #2;
 - 7.2.) Realizar a leitura para cada amostra individual, definindo anteriormente no ecrã inicial a quantidade de cada amostra presente (1 a 20µL), bem como as unidades da concentração de amostra final a apresentar (por exemplo, em ng/mL). O equipamento realiza o cálculo automático da concentração de RNA total presente em cada amostra.

Procedimento adaptado de: Thermo Fisher Scientific. *User Guide Manual: Qubit® RNA HS Assay Kits for Use with the Qubit® Fluorometer (MAN0002327).*; 2015.

7.4. Apêndice IV: Quantificação do RNA obtidas nas amostras em estudo através do ensaio Qubit

7.4.1. Quantificação do RNA no tratamento celular com GN

Tabela 7.2 - Resultados da quantificação do RNA total obtido nas células K562 expostas à GN.

Placa	Tratamento	Tempo	[RNA] em ng/mL
A	GN 100ng/mL	72 horas	16,9
	GN 250ng/mL		55,8
	GN 500ng/mL		9,76
	HU 25µg/mL		7,6
	DMSO 500ng/mL		94,4
	Controlo negativo		4,0
B	GN 100ng/mL		31,6
	GN 250ng/mL		14,1
	GN 500ng/mL		13,3
	HU 25µg/mL		4,8
	DMSO 500ng/mL		56,8
	Controlo negativo		8,82
C	GN 100ng/mL		15,6
	GN 250ng/mL		14,3
	GN 500ng/mL		33,6
	HU 25µg/mL		9,6
	DMSO 500ng/mL		63,6
	Controlo negativo		20,2
D	GN 100ng/mL	96 horas	112
	GN 250ng/mL		37,4
	GN 500ng/mL		16,4
	HU 25µg/mL		27,6
	DMSO 500ng/mL		32,2
	Controlo negativo		23,2
E	GN 100ng/mL		40,8

	GN 250ng/mL		14,2
	GN 500ng/mL		17,3
	HU 25µg/mL		62,2
	DMSO 500ng/mL		24,6
	Controlo negativo		52,6
F	GN 100ng/mL		120
	GN 250ng/mL		65,8
	GN 500ng/mL		60,4
	HU 25µg/mL		74,0
	DMSO 500ng/mL		15,5
	Controlo negativo		53,0

7.4.2. Quantificação do RNA no tratamento celular com EGCG

Tabela 7.3 - Resultados da quantificação do RNA total obtido nas células K562 expostas à EGCG.

Placa	Tratamento	Tempo	[RNA] em ng/mL
A	EGCG 100ng/mL	72 horas	32,6
	EGCG 250ng/mL		50,0
	EGCG 500ng/mL		33,6
	HU 25µg/mL		32,8
	Controlo negativo		35,8
B	EGCG 100ng/mL	72 horas	46,2
	EGCG 250ng/mL		43,2
	EGCG 500ng/mL		83,8
	HU 25µg/mL		26,2
	Controlo negativo		88,4
C	EGCG 100ng/mL	72 horas	55,4
	EGCG 250ng/mL		66,0
	EGCG 500ng/mL		61,4
	HU 25µg/mL		2,04
	Controlo negativo		58,6
D	EGCG 100ng/mL	96 horas	124
	EGCG 250ng/mL		16,6
	EGCG 500ng/mL		20,4
	HU 25µg/mL		1,33
	Controlo negativo		97,6
E	EGCG 100ng/mL	96 horas	43,4
	EGCG 250ng/mL		136
	EGCG 500ng/mL		110
	HU 25µg/mL		4,2
	Controlo negativo		104,0
F	EGCG 100ng/mL	96 horas	35,8
	EGCG 250ng/mL		36,0
	EGCG 500ng/mL		39,8
	HU 25µg/mL		9,58
	Controlo negativo		54,2

7.5. Apêndice V: : Fundamento, teoria base e procedimento para realização do PCR quantitativo em pequena escala

7.5.1. Fundamento

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) permite obter dados à medida que se desenvolve esta reação e conseguindo-se combinar, simultaneamente e num único passo, a amplificação e deteção do ácido nucleico (DNA) alvo através da adição de compostos fluorescentes¹¹³. Os corantes de ligação ao DNA emitem fluorescência quando se ligam a este e conforme as cadeias amplificadas se acumulam durante os ciclos, existe maior número de ligações a serem formadas e consequentemente, a intensidade da fluorescência aumenta proporcionalmente à concentração de DNA amplificado¹¹³.

7.5.2. Teoria adjacente à técnica de PCR quantitativo em tempo real

A Supermix iTaq™ Universal SYBR® Green é uma solução comercial pronta a usar para ensaios de qRT-PCR. Esta incorpora a enzima DNA polimerase iTaq, potenciadores e estabilizadores de reação, dNTPS (desoxirribonucleótidos tri-fosfato), MgCl₂, o corante SYBR Green I e uma mistura de corantes de referência passivos (como o ROX e a fluoresceína). Assim, apenas é necessário adicionar, para cada reação, a cadeia molde de DNA a amplificar e os primers específicos para o gene a detetar.

O corante SYBR Green I é um fluorocromo que se liga à cadeia dupla de DNA à medida que esta é sintetizada. Conforme as cadeias são amplificadas e acumulam durante os ciclos, existe maior número de ligações a serem formadas e consequentemente, a intensidade da fluorescência aumenta proporcionalmente à concentração de DNA amplificado.

A reação de PCR pode ser dividida em 4 fases através do gráfico de amplificação do ácido nucleico ao longo dos ciclos realizados (figura 7.1) – a fase linear ou base, a fase exponencial, a fase log-linear ou exponencial e a fase de plateau¹¹³.

Durante a fase linear ou base (normalmente os primeiros 10 a 15 ciclos), o PCR inicia-se e a emissão de fluorescência a cada ciclo ainda não ultrapassa o nível de fundo, sendo a fluorescência de fundo ou base calculada neste momento¹¹³. Numa fase exponencial, a fluorescência emitida atinge um limiar onde é significativamente maior (normalmente cerca de 10 vezes o desvio-padrão da base) que os níveis de fluorescência de fundo¹¹³. O ciclo de PCR em que ocorre este fenómeno dá-se então o nome de Ct (limiar do ciclo, limiar da fase exponencial ou *cycle threshold*)¹¹³. A quantidade de DNA inicial é inversamente proporcional a este valor, uma vez que quanto maior a quantidade de DNA na amostra inicial, mais rapidamente aumenta o sinal fluorescente e menor será o Ct¹¹³.

Durante a fase log-linear ou exponencial dá-se um período de amplificação linear com o produto do PCR a duplicar no fim de cada ciclo¹¹³. Finalmente a fase de *plateau* é atingida quando os

componentes da reação se tornam limitados e a intensidade de fluorescência não tem utilidade para cálculo dos dados¹¹³.

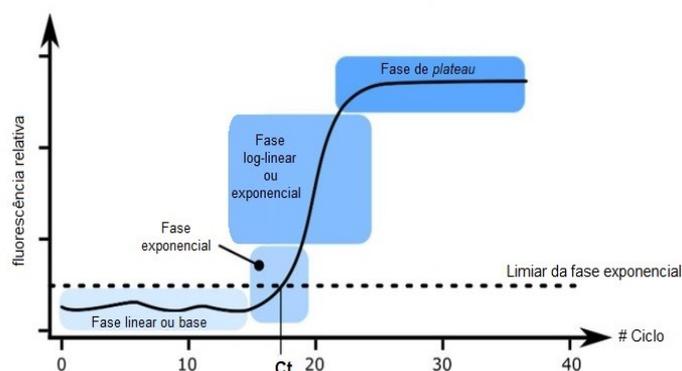


Figura 7.1 - Fases da curva de amplificação do PCR (base, exponencial, log-linear e plateau) da quantidade relativa da fluorescência emitida em função do número do ciclo. Adaptado de: Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. Sensors (Basel). 2018;18(4):1271. Published 2018 Apr 20. doi:10.3390/s18041271.

7.5.3. Procedimento

- 1) Preparação do mix para a reação de qRT-PCR num tubo de PCR para cada amostra e gene alvo a amplificar:

Tabela 7.4 – Componentes da reação de qRT-PCR

Componente	Volume de reação final - 20µL
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	4,0 µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	0,2 a 0,4 µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0,2 a 0,4 µL
DNA molde da amostra	Variável *
Água destilada específica para PCR	Até 20µL

* Para cDNA o volume final deve ser calculado para que a concentração varie entre 0.1 pg/µL -10 ng/µL.

Nota: O componente 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix é uma solução comercial pronta a usar para ensaios de PCR quantitativo em tempo real que incorpora um corante fluorescente (EvaGreen®), a enzima DNA polimerase HOT FIREPol®, um tampão otimizado, MgCl₂ a 12.5 mM, os dNTPs (desoxirribonucleótidos tri-fosfato) e um corante de visualização azul. Assim, apenas é necessário adicionar, para cada reação, a cadeia molde de DNA a amplificar e os primers específicos para o gene a detetar.

- 2) Realização de 45 ciclos de PCR no termociclador Bio-Rad iCycler®, com as seguintes condições de incubação para cada ciclo - 95°C por 2 minutos (ativação da polimerase); 95°C durante 30 segundos (desnaturação); 55°C por 30 segundos (annealing) e 72°C por 1 minuto (elongação).

Procedimento adaptado de: Solis BioDyne. Recommendations for HOT FIREPol® EvaGreen® QPCR Supermix. Estónia.

7.6. Apêndice VI: Resumo dos níveis de expressão génica pós-tratamento com EGCG, GN e HU

Tabela 7.5 - Níveis de expressão génica estatisticamente significativos obtidos nas células K562 pós-tratamento com EGCG, GN e HU.

Tempo de exposição	Tratamento	Níveis de transcrição génica estatisticamente significativos ($p < 0,05$)
72 horas	EGCG 100ng/mL	↑ <i>HDAC8</i>
	EGCG 250ng/mL	↑ <i>DNMT3A</i>
	EGCG 500ng/mL	
	GN 100ng/mL	↑ <i>DNMT1</i> , ↑ <i>DNMT3A</i> , ↑ <i>DNMT3B</i> , ↑ <i>HDAC1</i> , ↓ <i>HDAC8</i>
	GN 250ng/mL	↑ <i>DNMT1</i> , ↑ <i>DNMT3A</i>
	GN 500ng/mL	↑ <i>DNMT1</i> , ↓ <i>HDAC1</i> , ↓ <i>HDAC3</i> , ↓ <i>HDAC8</i>
	HU 25µg/mL	↑ <i>DNMT3A</i> , ↓ <i>HDAC8</i>
96 horas	EGCG 100ng/mL	↑ <i>HDAC1</i> , ↑ <i>HDAC8</i>
	EGCG 250ng/mL	
	EGCG 500ng/mL	↓ <i>HDAC1</i>
	GN 100ng/mL	
	GN 250ng/mL	↑ <i>HDAC3</i>
	GN 500ng/mL	↓ <i>DNMT1</i> , ↑ <i>HDAC2</i> , ↓ <i>HDAC8</i>
	HU 25µg/mL	↑ <i>DNMT3A</i> , ↓ <i>HDAC1</i> , ↓ <i>HDAC8</i>

Legenda: ↑ = indução transcricional; ↓ = inibição transcricional.